

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**RESISTENCIA A GLUCOCORTICOIDES EN  
CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE  
AGUDA TIPO B, PODRÍA ESTAR MEDIADA  
POR LA INTERACCIÓN DEL RECEPTOR  
DE GLUCOCORTICOIDES CON STAT5**

**Diana Maritza Loaiza Parra**

**Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Bogotá, Colombia  
2018**

# **RESISTENCIA A GLUCOCORTICOIDES EN CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA TIPO B, PODRÍA ESTAR MEDIADA POR LA INTERACCIÓN DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES CON STAT5**

**Diana Maritza Loaiza Parra**

Tesis presentada como requisito parcial para optar por el título de:  
**Magister en Bioquímica**

**Directora**  
**YADI ADRIANA UMAÑA PÉREZ**  
**Química MSc Doctor en Ciencias**

**Línea de Investigación**  
**Biomarcadores en cáncer**  
**Grupo de Investigación en Hormonas**

**Universidad Nacional de Colombia**  
**Facultad de Medicina**  
**Bogotá, Colombia**  
**2018**

*A mi familia...*

*Solo las personas que reconocen en ti la verdadera esencia de tu ser y no se apartan de tu lado a pesar de las adversidades, son llamados a quedarse en tu vida para siempre.*

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por llenarme de fortaleza en los momentos de tristeza y de penumbra. A mis padres y hermanos por siempre creer en mí y llenarme de ánimo en los momentos que más lo necesitaba.

A mi directora Adriana Umaña por permitirme hacer parte del Grupo de Investigación en Hormonas y darme la oportunidad de aprender y crecer como profesional y ser humano.

A todos los integrantes del Grupo de Investigación en Hormonas por su apoyo incondicional en mi proceso de formación y las orientaciones que me aportaron para mejorar mi trabajo, en especial a Juan José, Francisco, David, Oscar y Andrés.

A mis amigos de maestría y compañeros de lucha Wilmer, Michael, Erika y Sonia, quienes siempre tuvieron una palabra de aliento y me invitaron a continuar y no desistir.

## Resumen

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una neoplasia que se caracteriza por la formación abundante de células linfoides inmaduras, capaces de desplazar las células normales presentes en la médula ósea. Para su tratamiento se usan glucocorticoides (GC), debido a su capacidad para inducir apoptosis en las células tumorales. Datos epidemiológicos revelan que aproximadamente un 20% de los pacientes pediátricos con LLA, muestran resistencia al tratamiento con GC. Lo anterior permite categorizar a los pacientes según su respuesta en GC-sensibles y GC-resistentes, siendo estos últimos quienes reportan un mal pronóstico en respuesta al tratamiento. Los mecanismos que explican la resistencia a GC en blastos leucémicos aún no se han descrito completamente; algunas investigaciones sugieren que los Transductores de Señal y Activadores de la Transcripción (STAT) podrían tener la capacidad para modificar la actividad transcripcional inducida por los GC. En concordancia con lo anterior, en este estudio se propuso que la posible formación de heterodímeros entre el receptor de glucocorticoides (GR) y STAT5b podría modular la actividad transcripcional inducida por GR, modificando la capacidad de respuesta a GC y manifestando insensibilidad a éste. Como modelo biológico se planteó el uso de las líneas linfocíticas de linaje B, SUP-B15 y CCRF-SB. Inicialmente se probó la respuesta de las líneas a prednisolona (PRED) mediante ensayo colorimétrico, donde se evidenció una disminución en la viabilidad de SUP-B15, comparada con CCRF-SB tanto a 24 y 48 h posteriores al tratamiento. También se evaluó el efecto de PRED en la inducción a muerte celular. Las células se trataron con 1,0  $\mu\text{M}$  de PRED y se observó que el nivel de apoptosis es mayor en SUP-B15 comparado con CCRF-SB.

de forma dependiente del tiempo de exposición al medicamento. Ensayos de inmunoblot, permitieron ver la formación del complejo GR-STAT5b en citoplasma tanto en la línea sensible como la resistente, independiente de la presencia de PRED, en contraste la translocación del complejo al núcleo depende de la presencia del medicamento, lo que permite inferir la posibilidad de modulación de la actividad transcripcional de GR.

**Palabras clave:** Leucemia linfoide aguda de linaje B, STAT5b, Glucocorticoide, GR.

## Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a neoplasm that is characterized by the formation of immature lymphoid cells, capable of displacing normal cells present in the bone marrow. For its treatment glucocorticoids (GC) are used, due to its capacity to induce apoptosis in tumor cells. Epidemiological data reveal that approximately 20% of pediatric patients with ALL show resistance to treatment with GC. The above allows to categorize patients according to their response in GC-sensitive and GC-resistant, which are the last ones that report a poor prognosis in response to treatment. The mechanisms that explain GC resistance in leukemic blasts have not yet been fully described; Some research suggests that the Signaling Transducers and Transcription Activators (STAT) may have the ability to modify the transcriptional activity induced by the GC. In agreement with the above, in this study it was proposed that the possible formation of heterodimers between the glucocorticoid receptor (GR) and STAT5b could modulate GR-induced transcriptional activity, modifying the ability to respond to GC and manifesting insensitivity to it. As a biological model, the use of line B, SUP-B15 and CCRF-SB lymphocyte lines was proposed. Initially the response of the lines to prednisolone (PRED) was tested by colorimetric assay, which showed a decrease in the viability of SUP-B15, compared with CCRF-SB both at 24 and 48 h after treatment. The effect of PRED on the induction of cell death was also evaluated. The cells were treated with 1.0  $\mu$ M of PRED and the level of apoptosis is higher in SUP-B15 compared to CCRF-SB in a manner dependent on the time of exposure to the drug. Immunoblot assays allowed the formation of the GR-STAT5b complex in the cytoplasm in both the sensitive line and the resistant line, independent of the presence of PRED, in contrast the translocation of the complex to the nucleus depends on the presence of the drug, which allows inferring the possibility of modulation of GR's transcriptional activity.

**Key words:** Acute lymphoid leukemia of lineage B, STAT5b, Glucocorticoid, GR.





# Contenido

	Pág
Resumen .....	V
Lista de figuras .....	XI
Lista de tablas .....	XII
Lista de abreviaturas .....	XIII
<b>Introducción</b> .....	15
<b>1. Estado del arte</b> .....	17
<b>2. Marco teórico</b> .....	21
2.1 Leucemia linfoide aguda.....	21
2.1.1 Diagnóstico.....	23
2.1.2 Tratamiento.....	24
2.2 Factores asociados con un mal pronóstico en pacientes con LLA...	24
2.3 Glucocorticoides.....	25
2.4 Asociación de la vía de señalización GR con resistencia a GC.....	26
2.4.1 Expresión de GR.....	28
2.4.2 Proteínas asociadas con GR.....	29
2.4.3 Beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 (11 $\beta$ -HSD2) .....	30
2.4.4 Defectos en genes blanco.....	31
2.4.5 Factores de transcripción.....	32
<b>3. Objetivos</b> .....	34
3.1 General.....	34
3.2 Específicos .....	34
<b>4. Metodología</b> .....	35
4.1 Modelos celulares .....	35
4.2 Efecto de prednisolona en las líneas celulares SUP-B15 y CCRF-SB.....	36
4.2.1 Determinación de la concentración de inhibición media (IC50) para SUP-B15 y CCRF-SB.....	37
4.2.2 Evaluación de la actividad metabólica por ensayo MTT.....	38
4.2.3 Evaluación de la apoptosis inducida por GC.....	38
4.3 Evaluación de la expresión del gen de STAT5b en células resistentes.....	39
4.3.1 Extracción de ARN .....	39
4.3.2 Transcripción reversa .....	40
4.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qPCR) .....	40
4.4 Evaluación de la interacción entre STAT5 con GR en presencia de GR .....	41
4.4.1 Obtención de extractos celulares.....	41
4.4.2 Ensayos de Inmunoprecipitación .....	42

4.4.3 Verificación de la integridad de extractos proteicos por electroforesis SDS-PAGE.....	42
4.4.4 Análisis de proteínas: Electroforesis, transferencia e inmunodetección .....	43
4.5 Evaluación de interacción STAT5b y GR en condiciones in situ por inmunofluorescencia .....	44
4.6 Análisis estadístico .....	45
<b>5. Resultados</b> .....	46
5.1 Efecto de PRED en la viabilidad celular de líneas de leucemia linfocítica aguda de linaje B .....	46
5.2 Efecto de PRED en la muerte celular de las líneas de LLA de linaje B.....	49
5.3 Efecto de PRED en los niveles de expresión génica de STAT5b para la línea celular resistente a PRED .....	52
5.4 Identificación de la formación del complejo GR-STAT5b en presencia de PRED en células de LLA de linaje B .....	54
5.5 Efecto de PRED en la colocalización de STAT5b y GR al núcleo en condiciones in situ .....	58
<b>6. Discusión</b> .....	61
<b>7. Conclusiones</b> .....	66
<b>8. Bibliografía</b> .....	67

# Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 2-1:</b> Mecanismo de apoptosis mediado por glucocorticoides por la vía intrínseca (Modificado de Schlossmacher (18)).	<b>27</b>
<b>Figura 2-2:</b> Mecanismos de resistencia a glucocorticoides (Modificado de Ploner (21)).	<b>28</b>
<b>Figura 5-3</b> Efecto de PRED en la viabilidad celular de células de LLA de linaje B	<b>47</b>
<b>Figura 5-4</b> Comparación de la viabilidad celular de las líneas de LLA de linaje B a una misma dosis de PRED.	<b>49</b>
<b>Figura 5-5</b> Dot blot de CCRF-SB obtenido a las 48 h en presencia o ausencia de PRED.	<b>50</b>
<b>Figura 5-6</b> Efecto de PRED en la muerte celular asociada con apoptosis en las líneas celulares de LLA de linaje B.	<b>51</b>
<b>Figura 5-7</b> Porcentaje de apoptosis celular registrado a las 48 de tratamiento con PRED en las líneas de LLA de linaje B.	<b>52</b>
<b>Figura 5-8</b> Expresión génica de STAT5b en células CCRF-SB y MCF7 a diferentes tiempos	<b>53</b>
<b>Figura 5-9</b> Inmunoblot de EC derivados de células de LLA de linaje B, tratados a diferentes tiempos con PRED.	<b>55</b>
<b>Figura 5-10</b> Extractos citoplasmáticos inmunoprecipitados (IP) con Ab STAT5b, derivados de la línea celular SUP-B15.	<b>56</b>
<b>Figura 5-11</b> Extractos citoplasmáticos inmunoprecipitados (IP) con Ab STAT5b, derivados de la línea celular CCRF-SB.	<b>58</b>
<b>Figura 5-11</b> Microfotografías de inmunofluorescencia registradas en células CCRF-SB para STAT5b y GR.	<b>59</b>

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 2-1:</b> Clasificación inmunológica de la LLA según la EGIL (35).	<b>22</b>
<b>Tabla 2-2:</b> Grupos de riesgo en pacientes con LLA, de acuerdo a sus características clínicas (15).	<b>23</b>
<b>Tabla 4-3</b> Características generales de las líneas celulares SUP-B15 y CCRF-SB.	<b>36</b>
<b>Tabla 4-4</b> Características generales de anticuerpos primarios y secundarios usados para ensayo de inmunodetección.	<b>44</b>

## Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	Proteína activadora 1
ARN	Ácido ribonucleico
BAD	Proteína promotora de muerte asociada con BCL-2
BAG-1	BAG family molecular chaperone regulator 1
BCL-2	Linfoma de células B 2
BCL-XL	Linfoma de células B extra grandes
BCR/ABL	Gen de fusión de la translocación
BID	BH3 interacción agonista de dominio de muerte
BIM	BCL2-interacción mediador de muerte celular
CYP	Citocromo P450
DEX	Dexametasona
EGIL	European Group for the Immunological Characterization of Leukemia
EMR	Enfermedad mínima residual
EPO	Eritropoyetina
FKBP	Proteína de unión FK506
FLT3	Receptor tipo tirosina proteína quinasa FLT3
FOS	Proteína recombinante FOS C
GC	Glucocorticoide
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GR	Receptor de glucocorticoide
HIP	Proteína de interacción Huntingtin
HOP	Abreviatura de HSP70 y HSP90
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
HSP90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
LLA	Leucemia linfoide aguda
MDR1	Gen de resistencia a múltiples drogas
MMTV	Virus de tumor mamario de ratón
IL	Interleuquina
IgM	Inmunoglobulina M
IkB $\alpha$	Inhibidor de NF-kB
JAK	Janus quinasa
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica

MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCL-1	Proteína inducida por la diferenciación de células de leucemia mieloide
MDR1	Gen de resistencia a múltiples fármacos
MLL	Gen de linaje leucémico mixto
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
PRED	Prednisolona
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TEM-AML1	Proteína de fusión
TPO	Trombopoyetina

## Introducción

La leucemia linfoblastica aguda (LLA) es la neoplasia maligna más frecuente en la infancia, que se caracteriza por la formación abundante de células linfoides inmaduras, capaces de proliferar aceleradamente y desplazar las células normales presentes en la médula ósea impidiendo la formación de células sanguíneas saludables. Se estima a nivel mundial que la leucemia representa el 30% de los cánceres infantiles y un 70% de estos corresponde a LLA (1).

Para su tratamiento, se usan medicamentos de la familia de los glucocorticoides (GCs) como la prednisolona (PRED) y la dexametasona (DEX), debido a su capacidad para inducir apoptosis en las células linfoides tumorales mediado por el receptor de glucocorticoides (GR) (2).

Datos epidemiológicos revelan que aproximadamente un 20% de los pacientes pediátricos con LLA, muestran resistencia al tratamiento con GC (3), entendiéndose ésta como la incapacidad que presenta este fármaco en eliminar la mayor cantidad de células tumorales de forma efectiva después de 7 días de tratamiento, dando lugar a mayor riesgo de recaída (4). Lo anterior posibilita categorizar a los pacientes según el efecto que tenga el glucocorticoide en GC-resistentes o GC-sensibles, además de predecir un mal pronóstico en respuesta al tratamiento (2).

Aunque no se conocen los mecanismos que explican esa resistencia a GC en blastos leucémicos, investigaciones apuntan a que una regulación deficiente del receptor de glucocorticoides o defectos en los genes promotores de respuesta a

GR podrían estar relacionados (5,6). Otros estudios asocian la resistencia al gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR1) y genes implicados en el ciclo celular, el metabolismo de fármacos, la reparación del ADN, y la vía de la apoptosis intrínseca (5,7).

En algunas propuestas cobra importancia la interacción que presenta GR con factores de transcripción como AP-1, NF-kB y miembros de la familia de transductores de señal y activadores de la transcripción, STAT. En particular, en células mamarias, Stoecklin y colaboradores mostraron la interacción entre STAT5 y GR (8). Por otra parte, estudios en oligodendrocitos mostraron que la unión de GC-GR, posibilita la interacción de GR y STAT5a, modificando la actividad transcripcional inducida por GC, por regulación de la expresión de *bcl-xl*, previniendo así la apoptosis promovida por GC (9).

Se reconoce que STAT5 desempeña un papel en procesos proliferativos en células linfoides. En este orden de ideas, es de interés reconocer si la modulación por STAT5 sobre GR, podría modificar el efecto apoptótico inducido por GC en células de LLA de linaje B, conduciendo a la resistencia a GC y de esta forma, en una fase posterior, permitir el reconocimiento de dianas, llevando a su intervención terapéutica y de paso a una mejor acción de los glucocorticoides en pacientes con este tipo neoplasia.



## 1.Estado del arte

La leucemia linfocítica aguda es una enfermedad heterogénea que resulta de una lesión adquirida en el ADN de una sola célula en la médula ósea, contribuyendo a cambios en la función celular de las células madre hematopoyéticas (10). Los efectos de LLA incluyen el crecimiento y la acumulación anormal de blastos en la médula ósea que no pueden funcionar como células sanguíneas normales, afectando procesos celulares como la diferenciación, la proliferación y la muerte celular programada (10).

La LLA pediátrica es un grave problema de salud pública en nuestro país, y en el mundo alcanza alrededor del 30% de todos los cánceres diagnosticados en niños (1). Un 85% de los casos corresponden a LLA de linaje B, siendo esta la más frecuente y la principal causa de muerte por cáncer en niños y adultos jóvenes (11). En Colombia hasta el año 2007 se habían detectado entre 5.6 a 6 casos de LLA en niños por cada 100000 habitantes (12), y es claro que a la fecha su letalidad asociada con LLA continúa siendo alta (13).

Aunque se han desarrollado diferentes tratamientos para LLA pediátrico que han posibilitado la recuperación de hasta un 80%, un porcentaje aún elevado de pacientes presentan recaída o fenómenos de resistencia al tratamiento (14).

En una primera etapa del tratamiento se busca eliminar un 95% de las células en la médula ósea a través de la administración de medicamentos que incluye a los glucocorticoides (15). El estudio de estos ha permitido reconocer la importancia

que tienen en terapias anti-inflamatorias y oncolíticas, debido a su acción anti-proliferativa (16-18). El efecto de los GC sobre las células linfoides, incluye la detención del ciclo celular en la fase G1 y la inducción a apoptosis, teniendo un efecto anti leucémico en pacientes pediátricos con LLA (19).

Si bien el mecanismo de apoptosis inducido por GC no ha sido esclarecido, se considera que el primer paso para este evento viene de la interacción del glucocorticoide con su receptor. Esta interacción desata la disociación de las proteínas HSP70 y HSP90 unidas al receptor y la formación de dímeros con el ligando, los cuales se traslocan al núcleo e interactúan con los elementos de respuesta, dando paso a la transactivación o transrepresión de genes, que pueden conducir a la detención del ciclo celular y la apoptosis (5,20,21).

Esto ha suscitado que la comprensión de los mecanismos moleculares relacionados con la citotoxicidad y apoptosis inducida por GC sea crucial para explorar molecularmente la resistencia a GC, que se presenta en hasta el 20% de los pacientes con LLA. De las interacciones más notables que puede presentar el receptor GR son aquellas con factores de transcripción relacionados con supervivencia celular, entre ellos las proteínas STAT que juegan un papel importante en la modulación de la expresión de genes específicos. Su actividad es mediada por citoquinas quienes, al acoplarse a los receptores de superficie, inducen la expresión de programas génicos dependientes de ligando, que controlan funciones celulares de supervivencia, diferenciación y desarrollo, así como funciones especializadas asociadas con la respuesta inmune. Sin embargo, la señalización aberrante de STAT puede contribuir a la transformación maligna mediante la promoción de la progresión del ciclo celular y la supervivencia (22).

La familia STAT incluye actualmente siete miembros (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6), para quienes se han identificado más de 40 ligandos polipeptídicos que pueden inducir su activación (23). STAT3 y STAT5 han sido las proteínas más caracterizadas y para quienes se reportaron los primeros estudios. La primera se identificó por primera vez como un factor de transcripción que se une a los

elementos de respuesta IL-6 dentro del promotor de diferentes genes de proteínas en fase aguda (24). STAT5; se identificó como un factor de glándula mamaria regulada por la prolactina y activado por múltiples citoquinas como IL-2, IL-3, IL-5, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina (EPO) y trombopoyetina (TPO) (25). Investigaciones realizadas por el Grupo de Investigación en Hormonas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, también han descrito más aspectos asociados con la señalización de STAT5, donde se encontró una relación causal entre la disminución de la actividad transcripcional estimulada STAT5-GH y el efecto de la estatina en la reducción de los niveles de fosforilación de JAK2 y STAT5 en muestras de osteosarcoma (26). Tanto STAT3 como STAT5 han sido implicadas en la transformación celular y la carcinogenesis, y se encuentran sobreexpresadas en una variedad de cánceres hematopoyéticos entre las que se incluyen las leucemias (24).

Con base en lo anterior se ha detectado que la activación constitutiva de STAT5 en células de leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia mieloide crónica (LMC) imita muchos aspectos de la señalización inducida por IL-3 tales como la mitogénesis y aumento de la supervivencia (28). La activación de STAT1, STAT3 y STAT5 también se ha detectado en varios linfomas y en células de mieloma múltiple (29).

Lo anterior pone en evidencia la relación causal entre la activación aberrante de STAT5 y el desarrollo de cáncer, y la importancia de alterar su señalización para efectos del tratamiento, pues se ha identificado que ciertos tumores son refractarios a la quimioterapia por efecto de resistencia, particularmente cuando la terapia incluye la inducción con glucocorticoides (22). Al respecto, algunos estudios han mostrado que la unión de GR con STAT puede mejorar la transcripción inducida por STAT5 en presencia de prolactina (30,31); sin embargo, la formación de heterodímeros entre GR y STAT5 conduce a la inhibición de la translocación nuclear eficiente del receptor de glucocorticoides, disminuyendo la capacidad de respuesta a GC y manifestando insensibilidad a estos (32). Este mismo efecto inhibitorio sobre la transcripción inducida por GC se presentó en células murinas de

linfoblasto HT-2 estimuladas con IL-2, debido a la interacción STAT5-GR (33). Los linfocitos de ratones deficientes en STAT5 no desarrollaron la resistencia a los esteroides al ser estimulados con IL-2 en contraste a los linfocitos con expresión de STAT5 que desarrollaron fácilmente la resistencia (32). De acuerdo con lo anterior en este trabajo se propone que la interacción con los transductores de la señal y activadores de transcripción STAT puede ser un mecanismo de regulación del complejo GC-GR y por ende tener implicaciones en la sensibilidad o resistencia a glucocorticoides en pacientes con LLA, en donde particularmente STAT5 modula procesos de comunicación, proliferación, supervivencia y diferenciación celular. El reconocer este mecanismo de señalización celular en leucemia linfocítica podría abrir un camino para la formulación de dianas terapéuticas que permitan una mejor acción de los glucocorticoides en pacientes resistentes a este tipo de fármacos.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Leucemia linfoide aguda**

La leucemia es una enfermedad de la sangre en donde se presenta una proliferación no controlada de células endógenas de la médula ósea. Existen diversas manifestaciones de esta enfermedad, y si bien cada una de ellas progresa de manera diferente, en todas se observa una disminución del tejido hematopoyético normal en médula ósea y una posterior invasión de sangre periférica y otros tejidos (34).

Particularmente, la leucemia linfoide aguda se origina desde una sola célula hematopoyética precursora y compromete los linajes celulares B y T. Los efectos de LLA incluyen el crecimiento y la acumulación anormal de blastos inmaduros en la médula ósea que no pueden funcionar como células sanguíneas normales, afectando procesos celulares como la diferenciación, la proliferación y la muerte celular programada (11). Como resultado, cuando se diagnostica, el número de células sanguíneas sanas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) presenta un valor inferior al normal (11).

La LLA tiene una mayor tasa de incidencia en niños que en adultos. El estudio de marcadores inmunológicos, en conjunto con estudios morfológicos mejoró en gran medida el diagnóstico de la LLA y permitió ajustes en la clasificación. La tabla 1 relaciona algunos de los marcadores expresados en células de LLA, según las

directrices sistemáticas propuestas por el grupo europeo para la clasificación inmunológica de la leucemia (EGIL, European Group for the Immunological Characterization of Leukemia) (35).

**Tabla 1. Clasificación inmunológica de la LLA según la EGIL (35).**

LLA de linaje B (CD19+ y/o CD79a+ y/o CD22+)	
Pro-B-ALL (B-I)	No expresa otros antígenos de diferenciación de células B
LLA común (B-II)	CD10+
LLA Pre-B (B-III)	IgM+ citoplasmática
LLA-B madura (B-IV)	Citoplasmático o superficie, kappa o lambda +
LLA de linaje T (citoplasmático/membrana CD3+)	
LLA Pro-T	(T-I) CD7+
LLA Pre-T (T-II)	CD2+ y/o CD5+ y/o CD8+
LLA-T Cortical (T-III)	CD1a+
LLA-T Madura (T-IV)	Membrana CD3+, CD1a-

Aunque no es clara su etiología, estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que factores como predisposición genética, mutaciones en el periodo prenatal, exposición a infecciones bacterianas, radiación ionizante, agentes químicos, entre otros pueden estar asociados a predisposición de LLA (12). Las alteraciones genéticas que dan lugar a LLA de linaje B, pueden influir notoriamente en el funcionamiento adecuado de algunas vías de señalización. Un ejemplo de ello, se ha reconocido en la expresión de FLT3, un tipo de receptor tirosina quinasa, que puede afectar vías asociadas con la regulación de la vía de retinoblastoma y células en fase mitótica en muestras de pacientes con LLA (36). De igual modo, mutaciones en la proteína de fusión TEM-AML1 conllevan a la desacetilación de las histonas, inhibiendo la diferenciación de células hematopoyéticas mediante la inhibición de la transcripción de genes (10).

### 2.1.1 Diagnóstico

Independientemente del tipo de LLA, su diagnóstico se basa en el historial clínico del paciente, donde en un primer acercamiento, el médico reconoce la presencia de síntomas relacionados con baja producción de células normales en la médula ósea que pueden indicar que la persona padece de LLA, entre ellos cansancio, tez pálida, dificultad para respirar durante actividades físicas normales, presencia de hematomas o moretones negros y azules sin ninguna razón, aparición de manchas rojas, del tamaño de un alfiler en la piel, sangrado prolongado a cortadas menores, ganglio linfático agrandado, fiebre leve, entre otros (37). Estos síntomas acompañados de un bajo recuento de células sanguíneas, permite remitir al paciente con sospecha de LLA a un profesional especializado, quien se encargará de confirmar el diagnóstico, mediante análisis de sangre y médula ósea (37).

Con el diagnóstico, el paciente puede ser clasificado en grupos de riesgo bajo, medio y alto. En esta clasificación también se incluye la edad, el recuento de leucocitos, linaje de las células leucémicas, compromiso por infiltración del sistema nervioso central, anomalías citogenéticas y respuesta al tratamiento (Tabla 2) (15).

**Tabla 2. Grupos de riesgo en pacientes con LLA, de acuerdo a sus características clínicas (15).**

Riesgo	Características
<b>Bajo</b>	Edad: 1 a 9.9 años, leucocitos < 20.000/ mm <sup>3</sup> , linaje B, respuesta al día 8 (< 1000 blastos absolutos en sangre periférica), blastos de menos de 25% morfológicos al día 15, blastos menores de 5% al final de la inducción. EMR día 15 < 0,1%, fin inducción: ≤ 0,01%.
<b>Medio</b>	Edad: 1 año o mayor de 9.9 años linaje T, compromiso de SNC. EMR día 15: 0,1-10%, fin de inducción 0,01% ≤ 1%.
<b>Alto</b>	No respuesta al día 8, no respuesta al final de inducción (más de 5% de blastos morfológicos), genética t (4; 11), t (9; 22), MLL, BCR/ABL. EMR al día 15: ≥10% y al final de inducción ≥1%

Enfermedad mínima residual (EMR), Sistema nervioso central (SNC), Gen de linaje leucémico mixto (MLL), Gen de fusión de la translocación (BCR/ABL).

### **2.1.2 Tratamiento**

Posterior al diagnóstico, el paciente ingresa a remisión sujeto a un protocolo de quimioterapia que incluye una fase de inducción, postinducción y mantenimiento. La primera, busca la eliminación de un 95 % de las células malignas y normales en la médula ósea a través de la administración de prednisolona 60 mg/m<sup>2</sup> acompañado de un coctel de medicamentos que incluyen asparaginasa, vincristina y antraciclina (15). Su función terapéutica consiste en la inducción de apoptosis a partir de mecanismos desencadenados por la interacción entre GC y GR (2).

Luego de eliminar las células neoplásicas, se inicia la fase de postinducción. Esta consiste en uno o varios periodos de tratamiento intensivos con una dosis oral de dexametasona (6-10 mg/m<sup>2</sup>) en conjunto con vincristina, antraciclina, asparaginasa, citarabina y ciclofosfamida, los cuales permiten mantener la remisión leucémica, limitando la aparición de nuevas células malignas mediante la implementación de terapias de consolidación, reinducción y profilaxis al sistema nervioso central, según el protocolo y el grupo de riesgo en el que haya sido clasificado el paciente (15).

Por último, en la fase conocida como mantenimiento o continuación, se utilizan medicamentos que no fueron administrados anteriormente como son la tioguanina o el metotrexato a fin de mejorar los resultados de supervivencia (15).

## **2.2 Factores asociados con un mal pronóstico en pacientes con LLA**

A nivel mundial, las neoplasias malignas son consideradas como la segunda causa de muerte infantil, de las cuales aproximadamente el 30 % corresponden a



leucemia (12) y de este porcentaje un 85% de los casos con LLA infantil corresponden a LLA de linaje B (LLA-B). Las edades más frecuentes en la que se presenta LLA oscilan entre los 2 y 5 años, teniendo un margen de recurrencia después de los 50 años de edad (38).

Aunque se han desarrollado diferentes tratamientos para LLA pediátrico que han posibilitado la recuperación de hasta un 80% de los casos, el 20% restante de los casos recae. Posterior a la recaída, la tasa de recuperación es de aproximadamente un 25% a 40% (14).

Explicaciones sobre un pronóstico pobre al tratamiento, pueden estar relacionados con la biología y los subtipos de LLA. Por ejemplo, subtipos moleculares precursores de células B de LLA se caracterizan por presentar alteraciones citogenéticas, que podrían estar implicadas en la perturbación de vías de señalización celular claves en el desarrollo hematopoyético, proliferación, supervivencia celular y apoptosis, confiriendo a los clones y subclones leucémicos y pre leucémicos farmacoresistencia durante la terapia (39). Por tanto, es importante reconocer la edad y el subtipo molecular antes de proceder con el tratamiento y así predecir la evolución del paciente y el riesgo de recaída (4,40).

Otros factores de riesgo asociados con un mal pronóstico son las condiciones socioeconómicas, la distancia geográfica para acceder al tratamiento y el estado de nutrición del niño (20,41).

## **2.3 Glucocorticoides**

Aunque el mecanismo de apoptosis inducido por GC no ha sido esclarecido, se considera que el primer paso para la inducción de apoptosis mediada por GC se da a partir de la interacción de este con el receptor de GC (GR). Esta interacción desata la disociación de las proteínas HSP70 y HSP90 y la formación de dímeros de GR en presencia de GC, los cuales se traslocan al núcleo e interactúan con los elementos de respuesta a GC, dando paso a la transactivación o transrepresión de

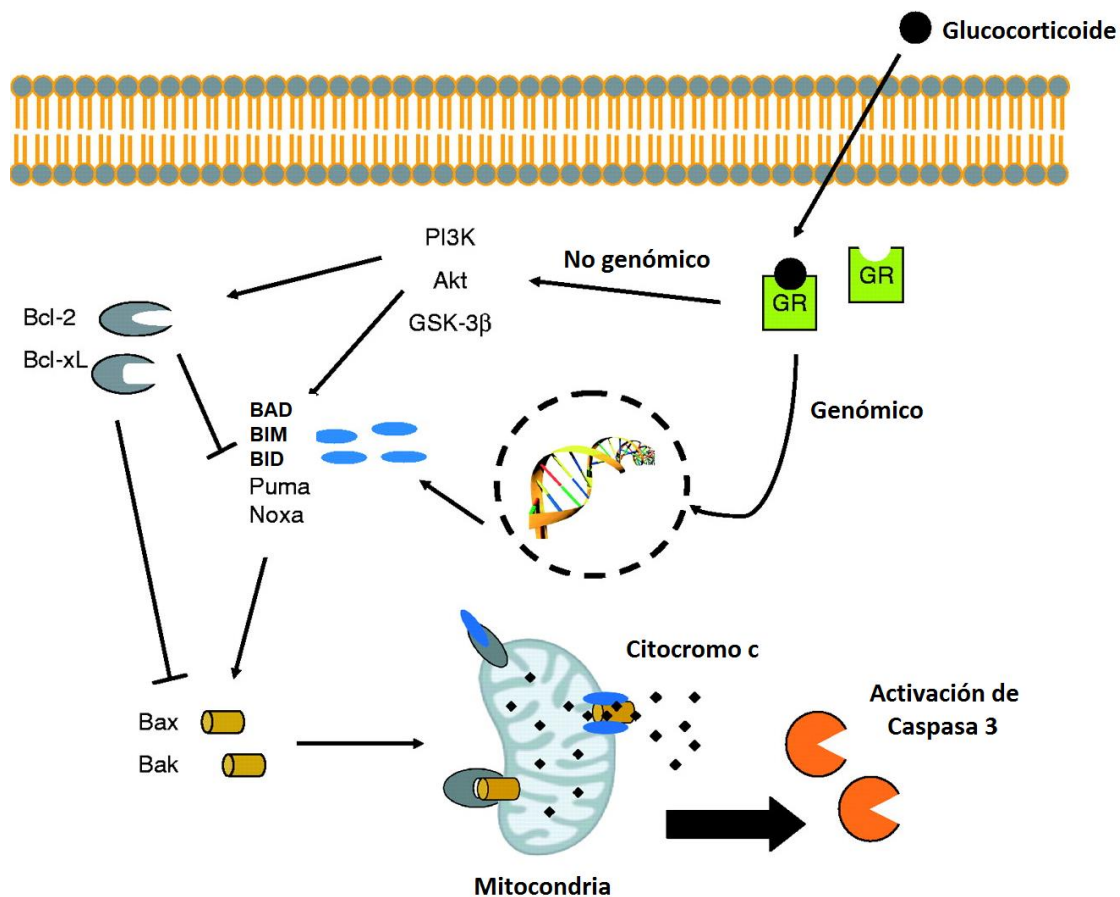
genes, que pueden conducir a la detención del ciclo celular y la apoptosis (2,17,21).

El trabajo de Jiang y colaboradores han sugerido que los GC pueden inducir muerte celular a través de la regulación de componentes de la vía intrínseca, mediante la activación de miembros proapoptóticos (BIM, BID y BAD) y/o inhibición de miembros antiapoptóticos (MCL-1 y BCL-XL) (2). La desregulación de la transcripción del reóstato BCL-2 puede desempeñar un papel importante en la inducción de apoptosis mediada por GC (Figura 1).

En lo que respecta a la vía extrínseca Planey, y colaboradores reportaron que el tratamiento con GC no altera la inducción de apoptosis en líneas celulares de LLA humanas mediada por caspasa 8, sugiriendo que esta vía no participa en el mecanismo apoptótico de GC (42,43). También se ha mostrado que los GCs afectan la función mitocondrial. En células GC-sensibles, se observó una variante de GR mitocondrial cuya translocación es inducida por la dexametasona causando apoptosis. Estos resultados sugieren que las translocaciones mitocondriales y nucleares de GR son reguladas diferencialmente, y que estas se correlacionan con la susceptibilidad a la apoptosis inducida por GC (42).

## **2.4 Asociación de la vía de señalización GR con resistencia a GR**

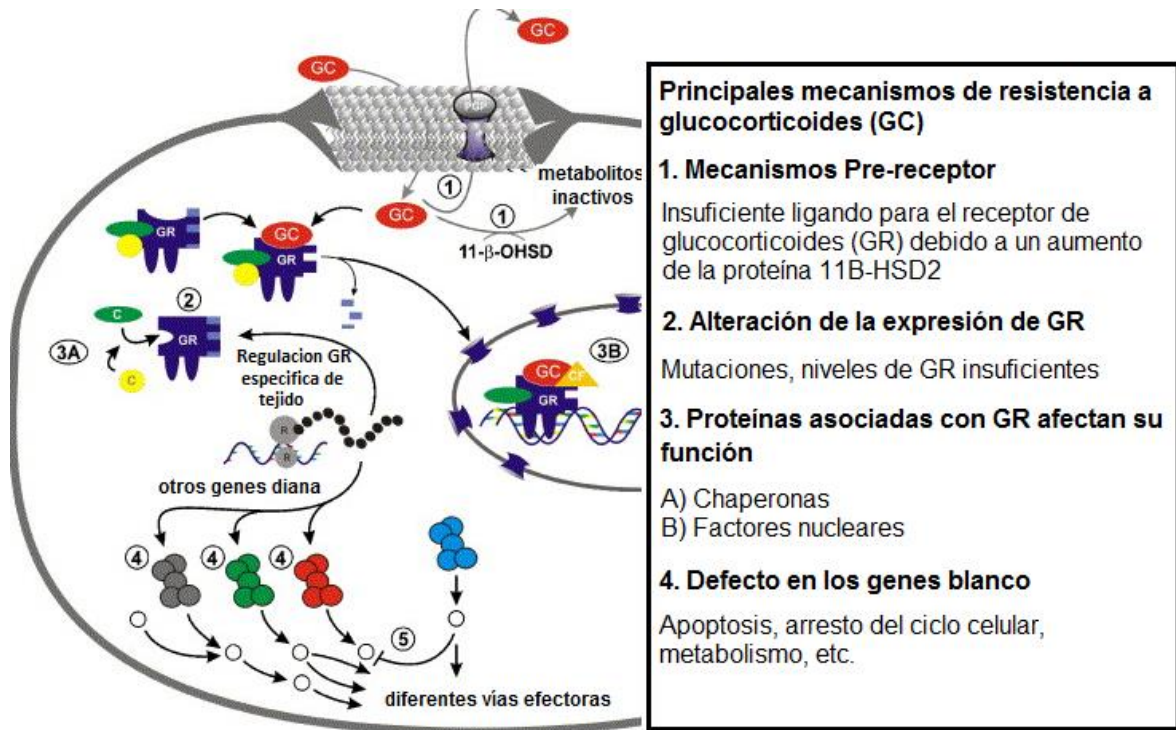
En el campo farmacológico, el uso de glucocorticoides resulta eficaz en el tratamiento de LLA, presumiblemente por su capacidad para regular la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular y la muerte celular programada. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a GC.



**Figura 1. Mecanismo de apoptosis mediado por glucocorticoides por la vía intrínseca (Modificado de Schlossmacher (18)).**

Algunos estudios sugieren que esta resistencia puede deberse a una baja regulación o defectos en los genes de respuesta a GR (44). Otros estudios muestran que genes implicados en el ciclo celular, metabolismo de fármacos, reparación del ADN y la vía intrínseca de la apoptosis podrían estar implicados en la resistencia a glucocorticoides (21,42); lo anterior sugiere la existencia de diversos mecanismos implicados en la resistencia de GC (Figura 2). Sin embargo, otros estudios son controversiales, y refutan dichas investigaciones, lo que dificulta el reconocimiento de dianas terapéuticas asociadas con resistencia. Por tanto, se hace necesario tener una visión más clara sobre cómo se desarrolla en células tumorales para mejorar terapias en neoplasias hematológicas que posibiliten la

recuperación de los pacientes y permitan consolidar un mecanismo que responda a las necesidades actuales de reducir el efecto de resistencia a GC.



**Figura 2. Mecanismos de resistencia a glucocorticoides (Modificado de Ploner (21)).**

### 2.4.1 Expresión de GR

La expresión de GR parece estar asociada a la resistencia a GC. Haarman y colaboradores evaluaron las cinco isoformas (GR $\alpha$ , GR $\beta$ , GR $\gamma$ , GR-P y GR-A) de GR y la incidencia de éstas en la resistencia a GC utilizando líneas celulares precursoras de células B (Pre-B) y T (Pre-T) de LLA infantil, clasificadas en PRED-resistentes y PRED-sensibles. Los resultados mostraron que la exposición a PRED no indujo una expresión diferencial de ARN mensajero de las isoformas de GR; por tanto, la resistencia de GC en general no podría relacionarse directamente con una regulación defectuosa de GR (45).

Sin embargo, posteriores estudios en líneas celulares de LLA de linaje T sensibles a GC y clones resistentes a GC derivados del tratamiento con DEX y con un vector lentiviral para la expresión de GR humano dependiente de tetraciclina, mostraron la dependencia de la dosis a GC para la inducción de apoptosis asociados a GR. A menores dosis de doxyciclina, los niveles de apoptosis fueron mínimos, incluso aumentando la dosis de DEX. En contraste, altas dosis de doxyciclina permitieron un aumento en la sensibilidad a DEX a concentraciones tan bajas como 10 nM, sugiriendo que la sensibilidad a glucocorticoides es dependiente de los niveles de GR (46). No obstante, estudios interesados en confirmar los datos anteriores, obtuvieron resultados que contradicen lo postulado al concluir que los niveles de expresión de GR no delimitan la respuesta apoptótica inducida por GC (19).

#### **2.4.2 Proteínas asociadas con GR**

Cuando GR no se encuentra unido a su ligando forma heterocomplejos con las moléculas de choque térmico HSP70 y HSP90, cuya función consiste en ensamblar de forma correcta a GR al momento de unirse con GC.

Investigaciones sobre el papel de HSP70 y HSP90 en la resistencia a glucocorticoides mostraron que independientemente de la sensibilidad a GC, los niveles de expresión de HSP70 y HSP90 no se modifican (47). Estos resultados se correlacionan con los niveles inalterados de expresión de un conjunto de moléculas co-chaperonas como HSP40, HSP70, HSP90, HIP, BAG- 1, HOP, p23, CYP-40, FKBP-51 y FKBP-52 en muestras diagnosticadas de pacientes pediátricos con LLA con buena respuesta a PRED (BRP) y pobre respuesta a PRED (PRP). Esto sugiere que los niveles de expresión de HSP70 y HSP90 no parecen estar implicados en la resistencia a GC.

### 2.4.3 Beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 (11 $\beta$ -HSD2)

La 11 $\beta$ -HSD2, es una isoenzima encargada de catalizar la conversión del cortisol biológicamente activo a cortisona (forma inactiva). En condiciones fisiológicas normales la 11 $\beta$ -HSD2 se expresa en los tejidos sensibles a mineralocorticoides y sirve para evitar la ocupación del receptor de mineralocorticoides por los glucocorticoides (44,48).

La sobreexpresión de 11 $\beta$ -HSD2 en algunos tumores y células malignas, podría contribuir a la resistencia a glucocorticoides durante el tratamiento con PRED o DEX (49). Al respecto se realizó un estudio para evaluar la forma en que la enzima 11 $\beta$ -HSD2 afecta la sensibilidad de GC en las células de LLA, donde se encontró que células Molt4f son más resistentes a PRED en contraste con las células CCRF-CEM, debido a un incremento en los niveles de ARN mensajero y de la proteína de 11 $\beta$ -HSD2 (18). El pretratamiento con un inhibidor de la enzima, incrementó la sensibilidad de las células Molt4f a PRED induciendo la muerte celular. Estos resultados sugieren que 11 $\beta$ -HSD2 es una causa de resistencia a GC en células LLA (18).

Tao y colaboradores también apoyaron estos hallazgos al encontrar niveles altos de 11 $\beta$ -HSD2 en líneas celulares Jurkat y Molt4 de LLA de linaje T y reconocieron que al inhibir la acción de esta enzima con el ácido 18 $\beta$ -glicirretínico (18 $\beta$ -GA), permitió la restauración de la sensibilidad a GC. También se observó que en presencia de bortezomic (un inhibidor de proteosoma), las células superan la resistencia a GC incluso en dosis bajas no citotóxicas, aumentando la susceptibilidad celular y la citotoxicidad inducida por GC (50), de una manera dependiente de p38 MAPK. Lo anterior sugiere que la activación de la vía p38 MAPK podría considerarse como estrategia terapéutica para superar la resistencia en LLA y que 11 $\beta$ -HSD2 podría ser una diana terapéutica en trastornos linfoproliferativos resistentes a GC (50).

#### 2.4.4 Defectos en genes blanco

BIM es una proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia BCL-2, que participa en la activación de BAX/BAK para inducir la permeabilización mitocondrial a partir de la liberación del citocromo c y dar lugar a la activación de caspasas (51,52). La actividad pro-apoptótica de BIM está regulada por mecanismos transcripcionales y postranscripcionales, algunos de ellos de interés quimioterapéutico para el desarrollo de fármacos que inducen la apoptosis a través de la regulación positiva y estabilización de BIM (51). De este modo, algunas investigaciones indican que los GCs podría activar directamente la maquinaria de apoptosis por la regulación de los componentes de la vía intrínseca a partir BIM (21).

Jiang y colaboradores analizaron tres líneas celulares sensibles a PRED (697, Sup-B15, y RS4; 11) y una línea celular resistente a PRED (Reh), clínicamente importantes en el estudio de LLA, con el fin de reconocer expresiones diferenciales de los miembros de la familia BCL-2 al momento del diagnóstico y después de 7 días de tratamiento con PRED (2). Los resultados permitieron visualizar la sobreexpresión de BIM en las células sensibles, lo que resulta útil para predecir la respuesta a PRED en pacientes con LLA independientemente del subtipo molecular. El silenciamiento de BIM en las células sensibles a PRED inhibió la apoptosis inducida por el GC (53). Estos resultados sugieren que BIM regula la apoptosis inducida por PRED y posiblemente participa en los procesos de resistencia a GC en células LLA.

Otras investigaciones han mostrado una respuesta contraria al observar que la sobreexpresión de BIM puede ser necesaria para la supervivencia de las células cancerosas en otros tipos de cáncer (54); por tanto, resulta ser clave realizar otros estudios que permitan reconocer el papel de BIM y la posible acción de sus isoformas en los procesos apoptóticos mediados por GC.

### 2.4.5 Factores de transcripción

Se ha mostrado que la unión del complejo GC-GR a elementos de respuesta (GRE) modula la expresión génica según el tipo celular. Sin embargo, GR puede reprimir la expresión de genes al unirse con factores de transcripción tales como AP-1 y NF- $\kappa$ B, consideradas proteínas clave en el control de vías de supervivencia y su interacción con GR mediante mecanismos indirectos puede jugar un papel crucial en la apoptosis inducida por GC (54, 55).

Estudios dedicados a evaluar el efecto inhibitorio de NF- $\kappa$ B en procesos apoptóticos inducidos por GC, mostraron que un aumento en la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  inducido por GR conduce a una disminución de los niveles de NF- $\kappa$ B, favoreciendo procesos apoptóticos. Sin embargo, resultados reportados por Heck y colaboradores encontraron que la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  no se relaciona directamente con una regulación a la baja de la actividad de NF- $\kappa$ B (56). Estudios en blastos leucémicos de niños con LLA se observó que no hay diferencias significativas en los niveles de NF- $\kappa$ B en los grupos de pacientes con pobre o buena respuesta a GC (57).

Un segundo factor de transcripción que presenta interacción con GR es AP-1, un complejo heterodimérico compuesto por proteínas pertenecientes a las familias de FOS y JUN, y que se encarga de regular genes participes en proliferación celular. Aunque se ha reconocido que una reducción en la funcionalidad de AP-1 puede mejorar la inducción a apoptosis, otros estudios muestran que no hay una relación directa entre el aumento de la actividad o cambios en el nivel de los componentes de AP-1 y su resistencia a GC (58). Además de las interacciones que presenta GR con los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) en las regiones promotoras de genes y la formación de complejos con AP-1 y NF- $\kappa$ B, se ha reportado interacciones STAT (32,33).

Los miembros de la familia STAT son un grupo de proteínas que se activan al ser fosforiladas por las Janus quinasas (JAK), a partir de la señalización de citoquinas.



La activación de STAT conduce a la unión de éste con elementos de respuesta dando lugar a la transcripción de genes que se encargan de modular procesos de comunicación, proliferación, diferenciación y supervivencia celular (59). Estos eventos dependientes de STAT pueden modularse por otros factores de transcripción o cofactores; se reconoce que uno de estos es el GR (59). Por ejemplo, STAT5 y GR, activan la transcripción con la unión de solo uno de ellos al promotor  $\beta$ -caseína (8), siendo esta la primera evidencia que estas vías de señalización aparentemente no relacionadas convergen a través de interacciones de los factores de transcripción.

Estudios en el epitelio mamario han mostrado que STAT6 también induce la expresión del gen  $\beta$ -caseína, lo cual puede estar asociado con una interacción física entre GR y STAT6 (61).

Biola y colaboradores usaron un modelo de células murinas CTLL-2 que presenta el promotor de transactivación MMTV del virus del tumor mamario de ratón, el cual induce la inhibición de GC por la expresión de IL-4, mostraron un aumento del efecto inhibitorio de IL-4 al sobreexpresar STAT6 (62), aportando pruebas de la interacción funcional y física existente entre GR y STAT6.

Estudios similares se han hecho para evaluar la interacción de GR con STAT1, STAT3 y STAT4. A pesar del alto grado de homología existentes entre las proteínas STAT, sus interacciones funcionales con GR no muestran un mecanismo similar (60).

## **3. Objetivos**

### **3.1 General**

Evaluar si el factor de transcripción STAT5b está involucrado en la resistencia a glucocorticoides mediada por el receptor de glucocorticoides en células de leucemia linfocítica aguda linaje B.

### **3.2 Específicos**

Evaluar la viabilidad de las líneas celulares de leucemia linfocítica aguda de linaje B, SUP-B15 y CCRF-SB al ser expuestas a glucocorticoide PRED.

Evaluar la expresión del gen de STAT5b en respuesta a PRED en una línea celular de leucemia linfocítica aguda de linaje B resistente a glucocorticoides.

Evaluar la interacción de STAT5b con el receptor de glucocorticoides en extractos celulares de las líneas de leucemia linfocítica aguda B, SUP-B15 y CCRF-SB.

## 4. Metodología

Como estrategia metodológica para evaluar la incidencia de STAT5b en la resistencia a GC, se consideró el uso de líneas celulares de LLA de linaje B con diferente sensibilidad a GC, SUP-B15 y CCRF-SB. Como control de interacción STAT5b y GR se usaron células derivadas de cáncer de seno, MCF7.

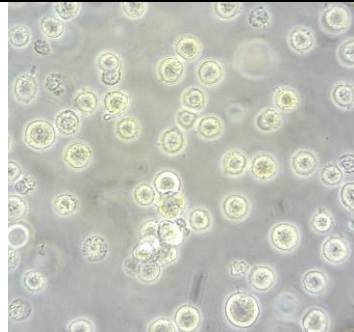

### 4.1. Modelos celulares

Las líneas celulares de LLA linaje B, SUP-B15 (CRL-1929™) y CCRF-SB (CCL-120™) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, [https://www.atcc.org/en/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Cell\\_Lines.aspx](https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx)).

La línea celular SUP-B15 se mantuvo en medio Dulbecco modificación Iscove de Gibco (IMDM) con 4,00 mM de L-glutamina ajustado para contener 17,86 mM de NaHCO<sub>3</sub> y 10 % de suero fetal bovino (SFB). La línea CCRF-SB y MCF7 se creció en medio RPMI 1640 (Gibco) con 0,10 mM de piruvato de sodio, 2,00 mM de L-glutamina y 10 % de SFB.

Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C y atmosfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%. Características adicionales de cada una de las líneas celulares de leucemia se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Características generales de las líneas celulares SUP-B15 Y CCRF-SB**

Línea celular	Descripción	Imagen*
<b>SUP-B15 (CRL-1929™)</b>	Línea celular de LLA de linaje B, derivada de células malignas recolectadas de médula ósea de un paciente de 8 años del género masculino, positivas para el cromosoma Filadelfia.	
<b>CCRF-SB (CCL-120™)</b>	Línea derivada de una preparación de capa leucocitaria de un paciente con LLA de 11,5 años del género masculino. Las células son positivas para virus de Epstein-Barr.	

\*Microfotografías obtenidas de cultivos en suspensión en el Laboratorio de Hormonas, Universidad Nacional de Colombia.

## **4.2 Efecto de prednisolona en las líneas celulares SUP-B15 y CCRF-SB**

Se estimó para SUP-B15 y CCRF-SB, la concentración de inhibición media IC<sub>50</sub> de prednisolona (P6004 Sigma Chemical Co, USA) por ensayo MTT.

Posteriormente, las líneas celulares SUP-B15 y CCRF-SB se trataron con PRED (a diferentes tiempos. Los efectos de PRED en la viabilidad celular, proliferación y apoptosis para cada línea celular fueron analizados.

#### 4.2.1 Determinación de la concentración de inhibición media (IC50) para SUP-B15 Y CCRF-SB

El ensayo colorimétrico MTT permite evaluar la actividad metabólica de las células biológicamente activas, a partir de la captación y reducción del tetrazolio amarillo MTT (bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico).

El reactivo es captado por las células activas presentes en el cultivo y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial, para generar equivalentes reductores como NADH y NADPH y su forma insoluble formazán, el cual es retenido al interior de las células, permitiendo su cuantificación por métodos espectrofotométricos (64).

Brevemente, se cultivaron por pozo  $2,0 \times 10^5$  células de SUP-B15 y CCRF-SB en placas de 96 pozos a 37°C, atmosfera húmeda y CO<sub>2</sub> al 5%. La sensibilidad o resistencia a glucocorticoides se determinó mediante la adición de concentraciones diferenciales de PRED (0,001; 0,01; 0,1 1,0 y 10 µM) por intervalos de tiempo de 20 y 44 h. Después del tratamiento se adicionaron 10 µL de MTT y se incubaron las células por 4 horas adicionales a 37°C, completando tiempos máximos 24 y 48 h. Los cristales obtenidos se disolvieron en 100 µl de una disolución que contenía 10% de SDS en 10 mM de HCl. La absorbancia se midió en el lector de microplaca Bio-Rad a una longitud de onda de 570 nm. Cada tratamiento se midió por triplicado. Con los datos de absorbancia obtenidos se calculó el porcentaje de viabilidad celular de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{Lectura tratamiento} - \text{Lectura blanco de tratamiento}}{\text{Lectura control de crecimiento} - \text{Lectura blanco de crecimiento}}$$

A partir de los datos obtenidos se realizaron gráficas del porcentaje de viabilidad celular vs logaritmo de la concentración de PRED por medio del software GraphPad Prism 6 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>), donde se determinó el IC 50 estimada para cada línea celular.

#### **4.2.2 Evaluación de la actividad metabólica por ensayo MTT**

Con base en la concentración de PRED definida por la curva de IC<sub>50</sub>, se procedió a verificar la resistencia a PRED en la línea celular CCRF-SB.

Brevemente, se cultivaron  $2,0 \times 10^5$  células en placas de 96 pozos a 37°C y atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%. Luego las células se trataron con 1,0 µM de PRED con intervalos de incubación de 0, 20 y 44 h. Como control se sensibilidad se tomó la línea celular SUP-B15. Pasados los tiempos de incubación en presencia y ausencia de PRED, todas las líneas celulares se trataron con 10 µl de MTT y se incubaron por 4 horas adicionales a 37°C, completando tiempos máximos 4, 24 y 48 h respectivamente. Los cristales formados se disolvieron conforme a lo mencionado anteriormente, así como los cálculos de porcentaje de viabilidad celular. Las gráficas de viabilidad se realizaron por medio del software GraphPad Prism 6.

#### **4.2.3 Evaluación de la apoptosis inducida por GC**

La apoptosis inducida por PRED se analizó por citometría de flujo usando el kit basado en anexina V-FITC (ANNEX100F de Bio-Rad). Brevemente se incubaron  $2,0 \times 10^5$  células/mL de las líneas celulares SUP-B15 y CCRF-SB, en presencia o ausencia de 1,0 µM PRED durante 6, 24 y 48 h. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1200 rpm y se lavaron con una disolución de PBS (138 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 8,1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1,5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) con agitación suave. Nuevamente las células se centrifugaron a 1200 rpm y se suspendieron con 200 µl de solución que contenía anexina V-FITC (buffer de unión pre-diluido con agua destilada en una relación 1:4 y 5 µl de anexina V-FITC). La mezcla se dejó incubar 10 min a la oscuridad y temperatura ambiente. Pasado el tiempo, las células se centrifugaron y se lavaron con buffer de unión y finalmente se trataron con 200 µl de una solución que contiene 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (buffer de unión pre-diluido con agua destilada en una relación 1:4 y 5 µl de 7-AAD) y se dejaron en incubación por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se analizaron 10000 eventos por muestra en el citómetro de flujo FACSCanto II-

Configuración 4-2-2. El porcentaje de células apoptóticas se definió por las células anexina V positivas, en comparación con el número total de eventos.

Finalmente, los datos obtenidos se analizaron por medio del software GraphPad Prism 6 donde se determinó el porcentaje de apoptosis inducido en cada una de las líneas celulares en presencia o ausencia de prednisolona.

### **4.3 Evaluación de la expresión del gen de STAT5b en células resistentes a GC**

Se realizó la extracción de ARN y síntesis de ADNc para evaluar la expresión del mensajero de STAT5b en presencia y ausencia de 1,0  $\mu$ M de PRED a diferentes tiempos en las líneas celulares CCRF-SB y MCF7, de quien se ha mostrado presentar interacción de STAT5 y GR.

#### **4.3.1 Extracción de ARN**

Brevemente,  $1,0 \times 10^7$  células de las líneas CCRF-SB y MCF7 se crecieron conforme a lo señalado anteriormente en platos de 60 mm y se trataron en presencia o ausencia de 1,0  $\mu$ M de PRED en periodos de 0, 24, 48 h. Cumplido el tiempo, las células se lavaron con PBS e inmediatamente se transfirieron a tubos eppendorf de 1,5 mL. Allí se adicionó 0,5 mL de Trizol Reagent® (Life Technologies), se homogenizaron y se dejaron en incubación por 15 min a temperatura ambiente. Luego, a la mezcla anterior se adicionó cloroformo, se agitó y se dejó actuar por 5 min. Pasado el tiempo la mezcla se centrifugó a 10000 rpm por 15 min a 4 °C y se tomó la fase acuosa. Posterior se realizó la precipitación del ARN total con isopropanol, se centrifugo a 10000 rpm por 10 min a 4 °C y se realizaron lavados con etanol al 75%. Finalmente, el pellet obtenido se disolvió en 30  $\mu$ L de agua y los ácidos nucleicos se cuantificaron por espectrofotometría. La integridad de los ARN obtenidos se visualizó por electroforesis en gel de agarosa.

Tratamientos similares se realizaron con células MCF7. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta iniciar el proceso de retrotranscripción.

#### 4.3.2 Transcripción reversa (RT-PCR)

Para la síntesis de la cadena de ADN complementario (ADNc) se partió de 1 µg de ARN total por muestra utilizando el kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 4.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qPCR)

Se evaluaron los cambios en la expresión génica de STAT5b para cada una de las líneas celulares luego del tratamiento con PRED por 24 y 48 h.

Brevemente, las reacciones de amplificación se realizaron con el sistema iQ SYBR® Green Master Mix (Bio-Rad) en equipo CFX96 (Bio-Rad) conforme la estandarización establecida por el Grupo de Investigación en Hormonas. Los primers correspondientes al gen STAT5b fueron:

Nombre de la secuencia	Secuencia 5' a 3'	OD	nmol	Peso	Tm
STAT5bF	CATTTTCCCATTGAGGTGCG	13.4	73.6	6099	60.4
STAT5aR	GGGTGGCCTTAATGTTCTCC	12.6	71	6115	62.4

Los pasos a seguir en este ensayo, así como las temperaturas a contemplar son mencionados en el protocolo establecido por Bio-Rad Manager. Como control de expresión se usó el gen de expresión constitutiva 18S.

La expresión del gen se cuantificó utilizando el método de Ct comparativo ( $\Delta\Delta C_t$ ). Los datos se muestran como relaciones normalizadas entre la expresión del gen de interés STAT5b y el gen de referencia 18S.



## **4.4 Evaluación de la interacción entre STAT5 y GR en presencia de GC**

### **4.4.1 Obtención de extractos celulares**

Se tomaron  $2,0 \times 10^7$  células de SUP-B15 para crecer en platos de 60 mm con IMDM. De igual forma se tomaron las mismas cantidades de células de CCRF-SB y se crecieron en RPMI. Todas las líneas se suplementaron con 10% de SFB en presencia o ausencia de  $1,0 \mu\text{M}$  de PRED para un volumen total de 3,0 ml por plato. Los tiempos de incubación por plato fueron 0, 5, 15 y 30 min.

Culminado cada tratamiento, se realizaron tres lavados de las células con PBS. Posteriormente, se adicionaron 5,0 ml de buffer A (20 mM Tris pH 7,4, 20 mM NaCl, 20 y mM  $\text{MgCl}_2$ ) y  $0,1 \mu\text{M}$  de ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), la mezcla se centrifugó a  $4^\circ\text{C}$  durante 5 min a 3000 rpm. El pellet obtenido se suspendió en 10 mM de buffer A que contiene 1,0 mM de ditioneitol (DTT), 0,2 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 20 mM de NaF y 0,2 mM fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF). El pellet junto con la mezcla se incubó por 20 min a  $4^\circ\text{C}$ . Seguidamente, la mezcla se centrifugó por 20 s a 14000 rpm y  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante obtenido corresponde a extracto citoplasmático (EC) y se conservó a  $-20^\circ\text{C}$  (66).

Seguidamente, se procedió a suspender el pellet en 60  $\mu\text{l}$  de buffer C (2% Glicerol, 2 mM HEPES pH 7,9, 42 mM NaCl, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,02 mM EDTA) que contiene 1 mM DTT,  $0,2 \mu\text{M}$  de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 20 mM NaF, 0,2 mM PMSF. La mezcla se dejó en incubación por 45 min en hielo, agitando cada 5 min. Finalmente, se centrifugó la mezcla por 5 min a 14000 rpm. El sobrenadante obtenido corresponde a extracto nuclear (EN) (66).

Cada uno de los extractos proteicos se cuantificaron usando el método del ácido bicinonínico (BCA) (23225 Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific), usando albumina sérica bovina como estándar. La conservación de los extractos se realizó en alícuotas a  $-70^\circ\text{C}$ .

#### **4.4.2 Ensayos de Inmunoprecipitación**

El ensayo de inmunoprecipitación permite analizar las interacciones proteína-proteína, a partir del uso de anticuerpos que reconocen la proteína en estudio y permiten su identificación.

Para este estudio se tomó 1 mg de extractos proteicos citoplasmáticos obtenidos de SUP-B15 y CCRF-SB. Se incubaron primero en 1 µg de anticuerpo anti-STAT5b (ab178941, abcam), buffer A e inhibidores de acuerdo a las concentraciones especificadas en el apartado anterior, durante 2 h a 4°C. Pasado el tiempo, los inmunocomplejos de cada extracto se capturaron añadiendo 30 µL de suspensión al 50 % de proteína A/G agarosa (20421 Pierce™ Protein A/G Agarose, Thermo Scientific) y se dejaron en agitación suave durante 1 h a 4°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se removió y el pellet obtenido se lavó con buffer A, y se centrifugaron a 10000 rpm por 1 min a 4°C, el procedimiento anterior se repitió tres veces. Luego de retirar todo el buffer, se dejó centrifugar el pellet por 5 min más a 10000 rpm y 4°C para retirar todo el sobrenadante y asegurar la limpieza del pellet.

Los inmunocomplejos se calentaron a 95 °C y se incubaron con un volumen de buffer carga que contenía 2% de 2-Mercaptoetanol, 20% de glicerol, 2% de SDS y 1% de azul de bromofenol. La conservación de las muestras se realizó en alícuotas a -20°C como se describe en los protocolos del Grupo de Investigación en Hormonas.

#### **4.4.3 Verificación de la integridad de extractos proteicos por electroforesis SDS-PAGE**

Se corrieron geles para verificar la integridad de los extractos proteicos citoplasmáticos derivados de células SUP-B15 y CCRF-SB por electroforesis SDS-PAGE en geles al 10% de mezcla de acrilamida (acrilamida y bisacrilamida) en condiciones reductoras que incluyeron 0.39 M de Tris (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,1% de persulfato de amonio y 0,04% de TEMED (tetrametiletilendiamina), utilizando una

rampa de voltaje de 80 a 100 V, de acuerdo al protocolo establecido en el Grupo de Investigación en Hormonas.

#### **4.4.4 Análisis de proteínas: Electroforesis, transferencia e inmunodetección**

Esta técnica permitió identificar la presencia de proteínas específicas, a partir de las muestras proteicas derivadas de las células de interés. Brevemente, la técnica incluye tres pasos: separación por SDS-PAGE, transferencia a un soporte sólido y reconocimiento de la proteína de interés utilizando anticuerpos específicos.

En un primer momento, se procedió a separar los extractos proteicos citoplasmáticos derivados de células SUP-B15, CCRF-SB y CCRF-CEM o el producto de la inmunoprecipitación por electroforesis SDS-PAGE conforme a las especificaciones mencionadas en el apartado anterior.

Luego de la separación, las proteínas se transfirieron vía húmeda a membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, la membrana se bloqueó con 5% de leche descremada en TBS a pH 7,4 (tris buffer salino) que contiene 2,5 mM de Tris-HCl, 20 mM de NaCl y 0,25 mM de KCl.

Para la identificación de las proteínas de interés se utilizaron anticuerpos primarios de anti-STAT5b y anti-GR (Tabla 4). Los sistemas se acoplaron a anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano para la visualización de la señal por quimioluminiscencia.

La expresión o activación de proteína se determinó por análisis densitométrico de las bandas inmunodetectadas con el sistema de fotodocumentación GelDoc™ EZ (68), haciendo uso del programa imagej-Fiji (<https://imagej.net/Fiji>).

**Tabla 4. Características de anticuerpos primarios usados para ensayo de inmunodetección**

Anticuerpo	Descripción
Anti-Receptor de Glucocorticoides (ab2768) de Abcam	Anticuerpo monoclonal de ratón [BuGR2]- Grado ChIP. Detecta una banda de aproximadamente 97 kDa
Anti-STAT5b (ab178941) de Abcam	Anticuerpo monoclonal de conejo [EPR16671]. Detecta una banda de aproximadamente 90 kDa

#### **4.5 Evaluación de interacción STAT5b y GR en condiciones in situ por inmunofluorescencia**

Se crecieron en placas de 12 pozos  $1,0 \times 10^5$  células de CCRF-BS y MCF7 (Control de interacción STAT5b y GR) en medio RPMI suplementado con 10% de SFB en presencia o ausencia de  $1,0 \mu\text{M}$  de PRED para un volumen total de  $1,0 \text{ ml}$  por pozo. Los tiempos de incubación por tratamiento fueron 0, 5, 15 min.

Trascurrido el tiempo, las células se fijaron por 15 min en 4% de paraformaldehído en PBS y se permeabilizaron en 0,1% de Triton X100 en PBS el mismo tiempo. Posteriormente, las células se bloquearon por 1 hora con 5% de leche descremada y se lavaron tres veces con PBS.

La incubación con los anticuerpos primarios y secundarios se realizó en 1% de leche descremada en intervalos de tiempo de 3 h y 0,5 h respectivamente a temperatura ambiente. El orden de incubación de los anticuerpos primarios y secundarios fue el siguiente:

1. Anti-Receptor de Glucocorticoides (ab2768, Abcam) + Goat Anti-Mouse IgG H&L (Texas Red ®) (ab6787)
2. Anti-STAT5b (ab178941, Abcam) + Goat-anti rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488 ab150077)

Posteriormente las láminas se lavaron dos veces con PBS y se realizó la tinción nuclear con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (D1306, Thermo Fisher).

Finalmente, las láminas se lavaron tres veces con PBS para remover el exceso de DAPI y se colocaron sobre portaobjetos con medio de montaje (glicerol al 70% en PBS). Las imágenes de las láminas correspondientes a cada línea celular se visualizaron en el microscopio de epifluorescencia Nikon eclipse 50i con el objetivo de 40X/0.75 y se analizaron con el programa image j-Fiji (<https://imagej.net/Fiji>).

## **4.6 Análisis estadístico**

La evaluación estadística de las diferencias en los resultados de los ensayos de MTT, fueron analizados por t-student. En este análisis se tomaron en cuenta diferencias significativas con  $p < 0,05$ ,  $p < 0,005$  y  $p < 0,0005$ .

Los ensayos de expresión génica se analizaron por ANOVA de un factor. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si  $p < 0,005$  o  $p < 0,0005$ . Todos los datos se procesaron por el programa GraphPad Prisma 6.

## 5. Resultados

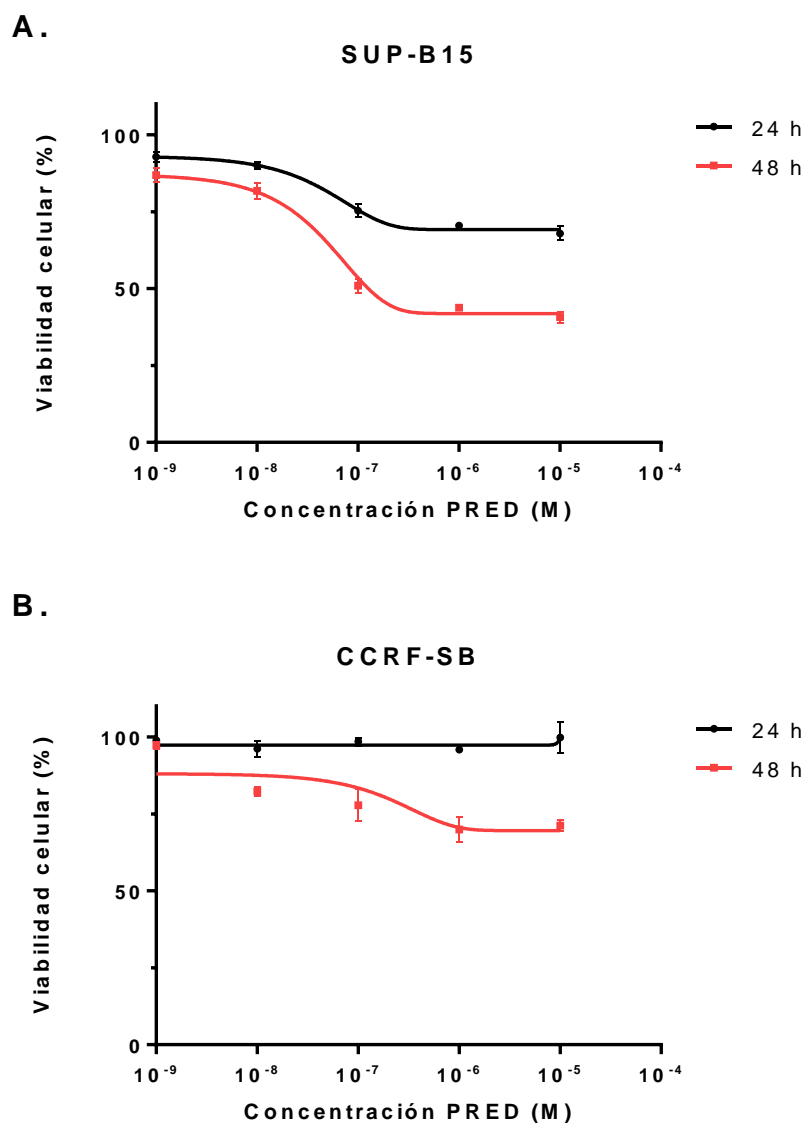
### 5.1 Efecto de PRED en la viabilidad celular de líneas de leucemia linfoide aguda de linaje B

Para evaluar el efecto que induce PRED en las líneas celulares SUP-B15 y CCRF-SB, inicialmente se determinó la concentración de inhibición media IC<sub>50</sub>, inducida por este fármaco, usando un rango de concentración de 0,001 a 10  $\mu$ M, en tiempos de 24 y 48 h.

Teniendo en cuenta la actividad metabólica detectada a partir del ensayo MTT, se observó una disminución de la viabilidad celular de las células SUP-B15 a medida que aumenta la concentración de PRED, como se muestra en la figura 3A. Esta disminución se acentúa con la presencia de PRED durante 48 h, ya que la proliferación de las células se reduce pasando de 75,3% a 50,9% a una concentración de 0,1  $\mu$ M. Lo anterior se verificó realizando el conteo del número de células viables para cada tratamiento en los mismos tiempos, usando el reactivo azul de tripán 1%, donde se observó un menor número de células vivas a las 48 h en contraste con las 24 h (datos no mostrados).

En lo que respecta a la línea celular CCRF-SB, hay dos aspectos que llaman la atención de acuerdo a lo que se observa en la figura 3B. 1) Para el tiempo de 24 h, la viabilidad celular no cambia conforme aumentan las concentraciones de PRED, conservando un porcentaje de viabilidad mayor al 90% en cualquiera de los intervalos de concentración. 2) A las 48 h de tratamiento con PRED y una concentración de 0,1  $\mu$ M, las células reducen su viabilidad celular

aproximadamente un 20,7% con respecto a las 24 h; sin embargo, no se presentó disminución de viabilidad por debajo del 50%.



**Figura 3. Efecto de PRED en la viabilidad celular de células de LLA de linaje B.** Se determinó la concentración inhibitoria media IC<sub>50</sub> para las líneas celulares A) SUP-B15 y B) CCRF-SB a partir del ensayo con el reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Se usaron las dosis de PRED indicadas en la figura por 24 y 48 h. Las barras de error representan la desviación estándar de la media de tres experimentos independientes.

Estos resultados permiten inferir una mayor susceptibilidad al medicamento por parte de las células SUP-B15, en comparación con las células CCRF-SB.

Respecto al valor de IC<sub>50</sub>, se tuvo en cuenta el reportado a las 48 h para las células SUP-B15 correspondiente a 0,421  $\mu$ M pues, aunque a las 24 h del tratamiento se notó una disminución en la viabilidad, esta no supera el IC<sub>50</sub>.

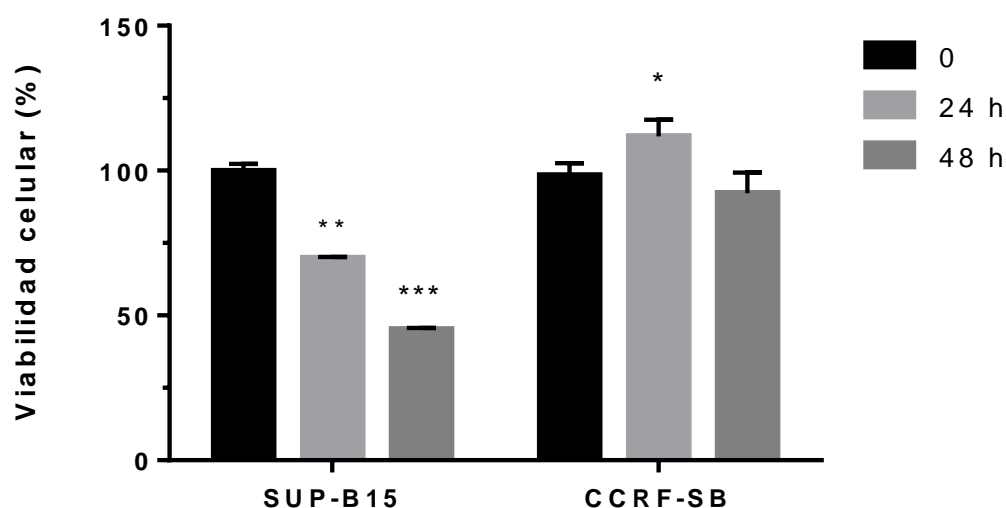
Con base en lo anterior se definió que la concentración a usar de PRED en los experimentos siguientes sería de 1,0  $\mu$ M, teniendo en cuenta que a concentraciones por encima de la estimada de IC<sub>50</sub>, se reduce aún más la viabilidad celular inducida por PRED en las líneas de LLA.

Posteriormente, se comparó el porcentaje de viabilidad celular de las células SUP-B15, CCRF-SB a una misma concentración de PRED durante 0, 24 y 48 h. Los resultados obtenidos permiten reconocer dos aspectos contundentes respecto a la sensibilidad/resistencia de las líneas celulares analizadas:

- 1) La línea celular SUP-B15 redujo su proliferación en un 29,9% a las 24 h y en un 54,6% las 48 h con respecto al tiempo inicial del experimento (ver figura 4), permitiendo considerarla una línea sensible a PRED soportado en las diferencias estadísticamente significativas a tiempo final ( $p < 0,0005$ ), siendo esta línea un control de sensibilidad a PRED para posteriores ensayos.
- 2) La línea celular CCRF-SB mostró diferencias significativas a las 24 h ( $p < 0,05$ ), al aumentar la proliferación 13,6% con respecto al tiempo inicial, lo cual podría estar asociado con un restablecimiento de la maquinaria celular. Transcurridas 48 h la proliferación celular disminuye un 6,0% con respecto al tiempo inicial.

Diferencias significativas en la viabilidad celular para cada intervalo de tiempo en las células SUP-B15 y CCRF-SB, permiten reconocer a CCRF-SB como una línea resistente a PRED, teniendo en cuenta que la sensibilidad de SUP-B15 es dependiente del tiempo de exposición al medicamento contrario a lo observado con CCRF-SB.





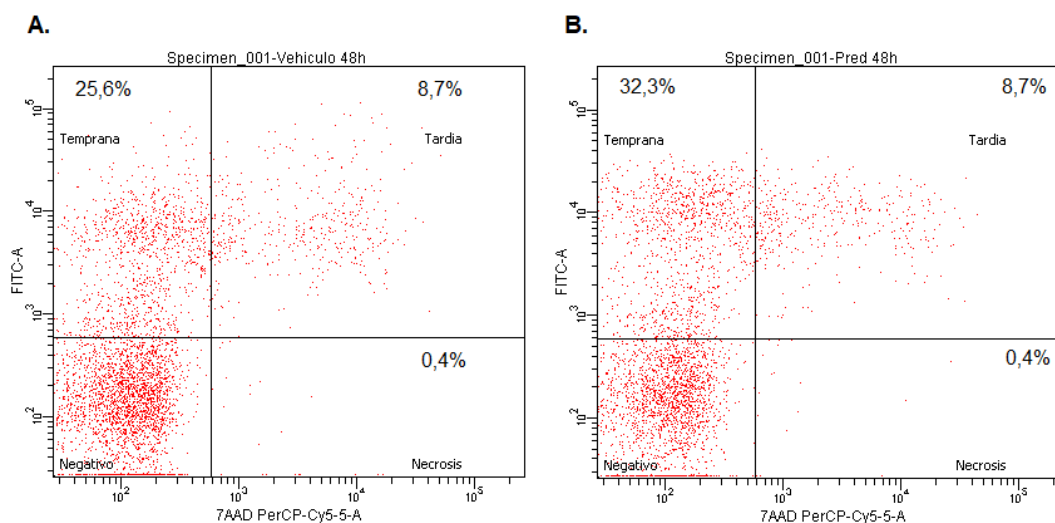
**Figura 4. Comparación de la viabilidad celular de las líneas de LLA de linaje B a una sola dosis de PRED.** La viabilidad se evaluó a partir del ensayo MTT para líneas celulares SUP-B15 y CCRF-SB. Las células se trataron con 1,0  $\mu$ M de PRED por 0, 24 y 48 h. El análisis de t-student mostró diferencias significativas con  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*) y  $p < 0,0005$  (\*\*\*).

## 5.2 Efecto de PRED en la muerte celular de las líneas de LLA de linaje B

Para acercarse al mecanismo por el cual se presenta una disminución en la proliferación celular para las líneas SUP-B15 y CCRF-SB, se usó Anexina V y 7-AAD acoplada a detección por citometría de flujo. El primer reactivo muestra muerte celular asociada con apoptosis; el segundo indica el número de eventos necróticos ocurridos. Las células se trataron con 1,0  $\mu$ M de PRED durante 6, 24 y 48 h.

Los resultados obtenidos se infirieron con base en las representaciones biparamétricas reportadas por el equipo para cada tratamiento. Dicho reporte contiene un dot plot que representan el número de eventos de fluorescencia y su

distribución en cuadrantes que combinan los umbrales inducidos por anexina V o 7AAD, tal como se muestra en la figura 5.



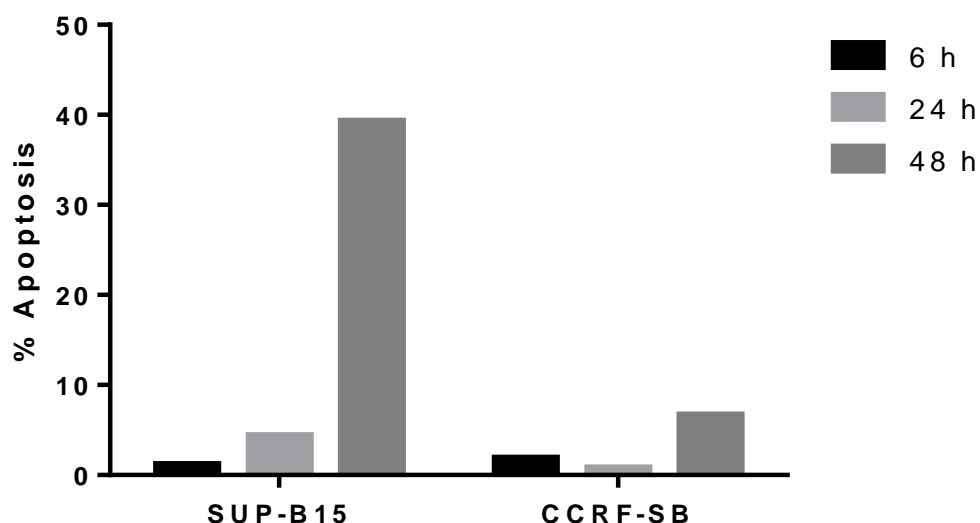
**Figura 5. Dot plot de CCRF-SB obtenido a las 48 h en ausencia o presencia de PRED.**

Las células CCRF-SB incubadas con el vehículo (A) o con PRED 1,0  $\mu$ M (B) durante 48h se marcaron con tinción anexina V/7-AAD. La representación biparamétrica permite evaluar el número de eventos asociados con apoptosis temprana (cuadrante superior izquierdo), tardía (cuadrante superior derecho) o necrosis (cuadrante inferior derecho), conforme al desplazamiento que presenta una misma población en cada cuadrante.

De manera consecuente con los ensayos de proliferación, la línea SUP-B15 presentó una marcación para anexina V de aproximadamente 39,3% en el tiempo de las 48 h, en contraste con las células CCRF-SB, cuyo porcentaje de muerte celular asociada con apoptosis fue de 6,7%, para el mismo intervalo de tiempo (ver figura 6). Cabe anotar que a mayor tiempo de exposición al medicamento el porcentaje de apoptosis aumenta en la línea sensible. Incluso se observó que el porcentaje de necrosis en SUP-B15, también aumentó con respecto al tiempo, alcanzando un valor de 5,5% a las 48 h, en contraste con CCRF-SB que no mostró necrosis apreciable.

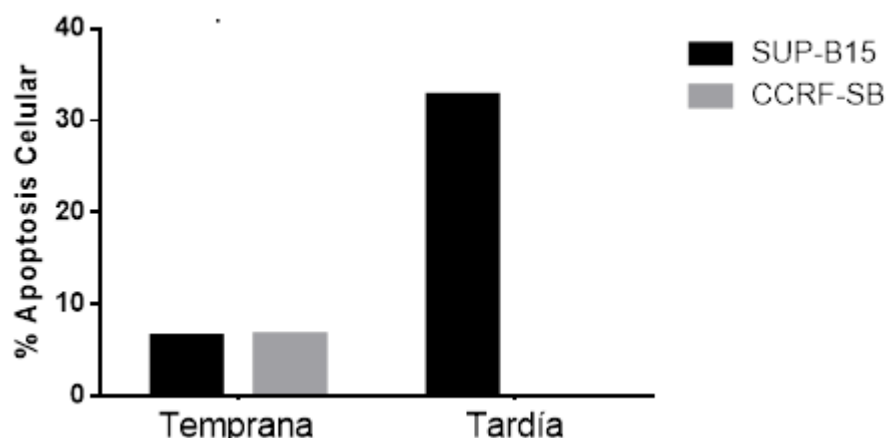
En lo que respecta al porcentaje de muerte celular de CCRF-SB, llama la atención que a las 24 h de tratamiento con PRED, el porcentaje de muerte celular disminuye la mitad en contraste con las 6 h, reportando un valor de 0,8% (ver figura 6).

A las 48 h de tratamiento el porcentaje de muerte celular aumenta solo un 4.8% en comparación con el tiempo 0.



**Figura 6. Efecto de PRED en la muerte celular asociada con apoptosis en las líneas celulares de LLA de linaje B.** Se realizó una comparación cualitativa entre las líneas SUP-B15 y CCRF-SB. Cada línea celular se trató con 1,0  $\mu$ M de PRED a 6, 24 y 48 h y posteriormente mediante la marcación con anexina V/7-AAD se analizaron los eventos apoptóticos existentes por citometría de flujo. Todos los datos obtenidos fueron normalizados.

Las diferencias en los niveles de apoptosis se reconocen mejor al comparar los porcentajes de apoptosis temprana y tardía a las 48 h de tratamiento con PRED (ver figura 7), tiempo en el cual se evidencia el mayor índice de apoptosis para SUP-B15. De acuerdo a los datos, aproximadamente un 32,8 % de las células SUP-B15 ya se encuentra en apoptosis tardía, en contraste con CCRF-SB, el cual no registra. Sin embargo, presenta un porcentaje similar de apoptosis temprana con SUP-B15.



**Figura 7. Porcentaje de apoptosis celular registrado a las 48 de tratamiento con PRED en las líneas de LLA de linaje B.** Los datos obtenidos fueron normalizados de acuerdo a las diferencias entre tratamiento y vehículo registradas para cada línea celular.

Con base en los resultados, se confirmó la sensibilidad de SUP-B15 a PRED y la resistencia de CCRF-SB al medicamento, siendo viable el uso de esta última línea como línea celular de resistencia a GC.

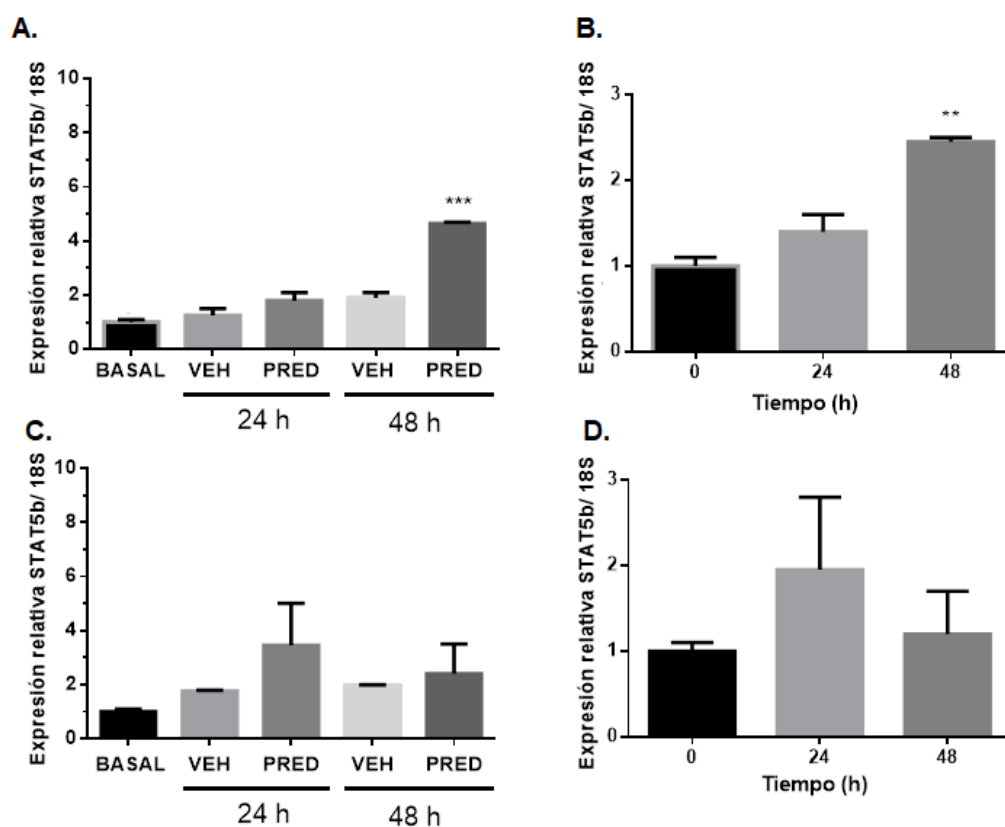
### **5.3 Efecto de PRED en los niveles de expresión génica de STAT5b para la línea celular resistente a PRED**

Luego de evaluar el efecto de PRED en la proliferación y muerte celular para cada una de las líneas celulares y confirmar la resistencia de CCRF-SB al medicamento, se procedió a analizar los niveles de expresión relativa del gen de STAT5b en presencia de PRED. Los resultados se compararon con la expresión relativa que registra la línea celular MCF7, que se ha reportado que expresa STAT5 y es sensible a GC (68), omitiendo la evaluación de la expresión relativa del gen de STAT5b en SUP-B15.

Respecto a lo anterior, para CCRF-SB se observó un incremento significativo en los niveles de mensajero de STAT5b en tratamiento con PRED, para el tiempo de 48 h respecto a su expresión basal ( $p < 0,005$ ), tal como se observa en la figura 8A y B. Al comparar la expresión relativa en presencia de solamente el vehículo a las

24 y 48 h, se reconoce que, aunque la expresión de STAT5b aumenta ligeramente, estos valores no son estadísticamente significativos en contraste con las células que se trataron con PRED (ver figura 8A).

En lo que respecta a la línea celular MCF7 (Figura 8C y D), aunque la diferencia entre los tratamientos no es estadísticamente significativa, se observa que a las 24 h en presencia de PRED, la expresión relativa de STAT5b alcanza un máximo de expresión comparado con los demás tratamientos.



**Figura 8. Expresión génica de STAT5b en células CCRF-SB y MCF7.** A) Extracto de ADNc de células de CCRF-SB, B) niveles normalizados de expresión relativa de STAT5b en células CCRF-SB, C) extracto de ADNc de células MCF7, D) niveles normalizados de expresión relativa de STAT5b en células MCF7. Las dos líneas celulares se trataron con 1,0  $\mu$ M de PRED o en presencia de etanol en tiempos de 0, 24 y 48 h. El análisis de un factor ANOVA mostró diferencias significativas de  $p < 0,005$  (\*\*) y  $p < 0,0005$  (\*\*\*).

Los anteriores resultados sugieren que un aumento en la expresión de ARNm de STAT5b en las células CCRF-SB, podría estar asociado a una mayor expresión de la proteína en presencia del medicamento y posiblemente una mayor resistencia a GC, por tanto, es de interés en los siguientes experimentos, reconocer si existe alguna correlación entre los niveles de expresión del gen y lo que ocurre a nivel proteico para esta misma línea celular comparado con la línea sensible a GC.

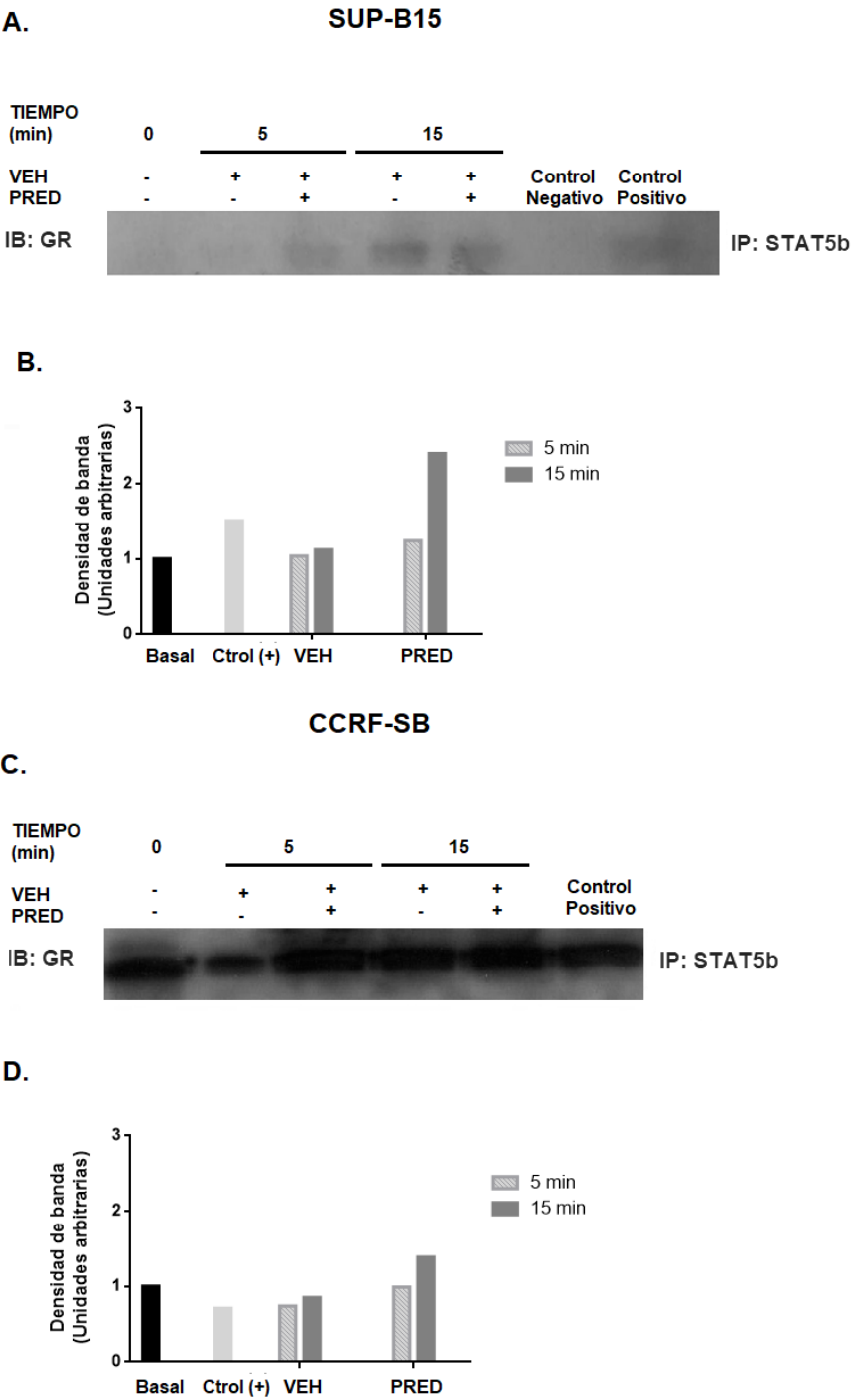
#### **5.4 Identificación de la formación del complejo GR-STAT5b en presencia de PRED en células de LLA de linaje B**

De antemano se sabe que para lograr inducir apoptosis en las células de LLA, los GC deben unirse al receptor de GC intracelular (GR), y traslocarse a núcleo para unirse a los elementos de respuesta a GC (EGR); sin embargo, la posible interacción de GR con otros factores de transcripción como STAT5b, podrían interferir con la función de GR causando resistencia (4,6).

Para examinar la posible interacción física entre GR y STAT5b, se usaron extractos citoplasmáticos inmunoprecipitados con anti STAT5b, para luego detectar la formación del complejo GR-STAT5b por inmunoblot en las líneas celulares SUP-B15 y CCRF-SB.

Resultados obtenidos para ver la expresión de GR en los tiempos de 0, 5 y 15 min en los extractos IP de SUP-B15, permitieron reconocer que en presencia de PRED, la intensidad de las bandas aumenta conforme aumenta el tiempo. La misma situación se observó en ausencia de PRED. Lo anterior sugiere que formación del complejo GR-STAT5b en el citoplasma (ver figura 9A Y B).

En los extractos proteicos derivados de CCRF-SB también se observa que la expresión de GR aumenta ligeramente con el transcurrir del tiempo, pues en condiciones con o sin tratamiento, GR se expresa (ver figura 9C y D). Lo anterior sugiere nuevamente la formación del complejo GR.

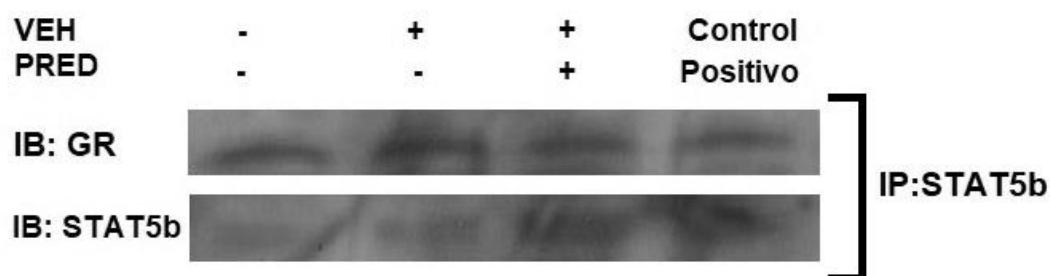


**Figura 9. Inmunoblot de EC derivados de células de LLA de linaje B, tratados a diferentes tiempos con PRED. A) y C) Inmunoblot de EC inmunoprecipitados con anticuerpos GR de SUP-B15 y CCRF-SB. B) y D) Densitometría de banda calculada para cada tratamiento a partir del inmunoblot obtenido para SUP-B15 y CCRF-SB**

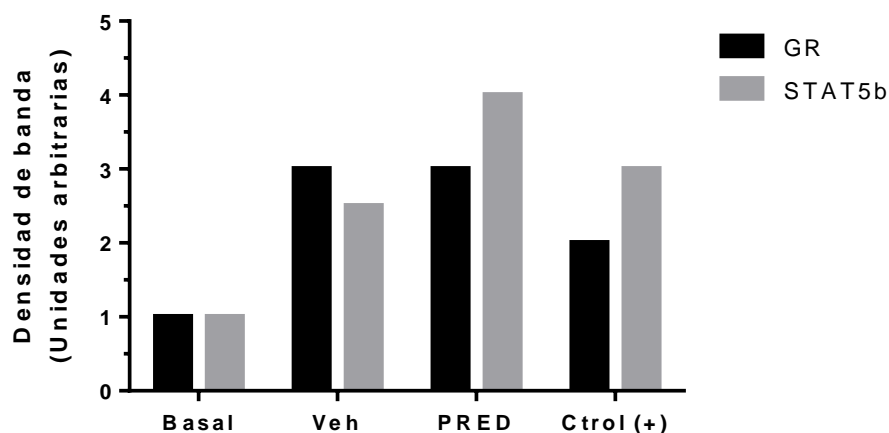
respectivamente. Las células fueron tratadas con 1,0  $\mu$ M de PRED o con vehículo por 0, 5 y 15 min. El control positivo es extracto total de MCF7

Para para comprobar la interacción física de las proteínas en el citoplasma, muestras de EC correspondientes al tiempo de 5 min se IP nuevamente con STST5b y se evaluaron por inmunoblot con anti-GR y luego con anti-STAT5b.

A.



B.



**Figura 10. Inmunoblot de extractos citoplasmáticos inmunoprecipitados (IP) con anti-STAT5b de la línea celular SUP-B15.** A) Inmunoblot de fracciones proteicas de citoplasma inmunoprecipitadas contra anticuerpos GR Y STAT5b. B) Densitometría de banda calculada para cada tratamiento a partir del inmunoblot. Las células se trataron con 1,0  $\mu$ M de PRED o con vehículo por 5 min. La condición basal indica que las células presentan únicamente medio y SFB, conforme a las condiciones manejadas para su cultivo. El control positivo es extracto total de MCF7.

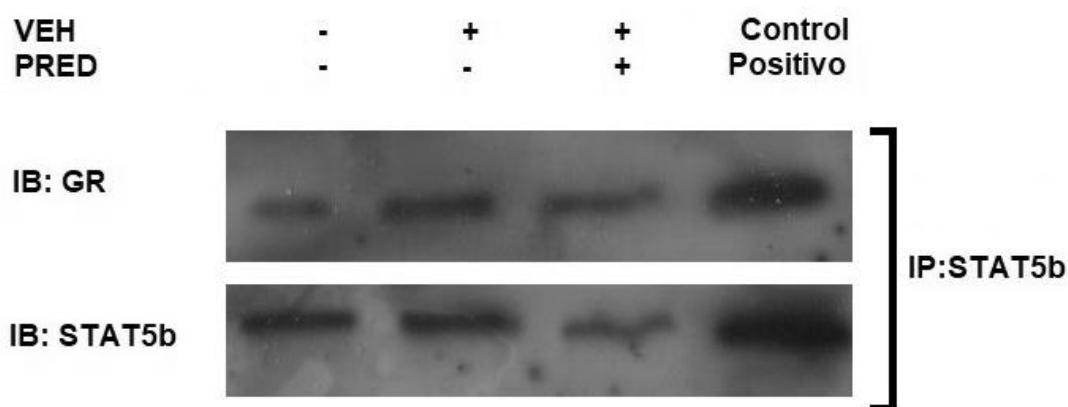


Al respecto, se evidenció que la intensidad de la banda de GR en presencia de PRED aumento 2 unidades en comparación con el basal y se mantuvo en presencia de PRED como se observa en la figura 10 A y B. Al realizar el inmunoblot contra STAT5b, se observa que la intensidad de la banda aumenta en forma gradual, siendo mayor en presencia de PRED. Por tanto, se puede inferir que la formación del complejo GR-STAT5b se da en cualquier condición. Sin embargo, la proporción de las proteínas interactuantes puede variar según el tratamiento.

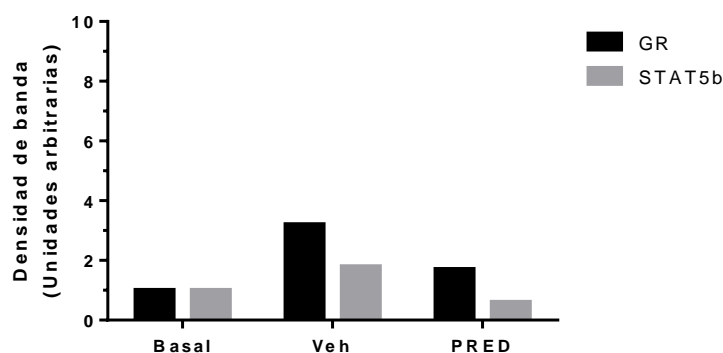
En los extractos proteicos citoplasmáticos derivados de CCRF-SB, se observa que la intensidad de GR aumenta en presencia del vehículo y disminuye en presencia de PRED en comparación con la expresión basal pasando de 2,2 a 0,7 unidades de densidad (ver figuras 11A y B). Similar comportamiento se observó para STAT5b, ya que la intensidad de la banda en presencia del vehículo aumento en 0,8 unidades y en presencia de PRED disminuyo 0,4 unidades por debajo de la intensidad basal. Aunque no es clara la correlación que existe entre la intensidad en la expresión entre GR y STAT5b en las diferentes condiciones.

Finalmente, los resultados para SUP-B15 y CCRF-SB permiten evidenciar que el complejo GR-STAT5b se forma en el citoplasma sin necesidad del medicamento tanto en la línea sensible como resistente; sin embargo, solo se puede hacer una interpretación cualitativa de estos resultados, concluyendo en una asociación física de GR y STAT5b en presencia o ausencia de PRED. Queda por aclarar si la interacción GR-STAT5b también ocurre en núcleo y qué papel desempeña en la resistencia a glucocorticoides.

A.



B.



**Figura 11. Extractos citoplasmáticos inmunoprecipitados (IP) con anti-STAT5b, derivados de la línea celular CCRF-SB.** A) Inmunoblot de fracciones proteicas de citoplasma inmunoprecipitadas contra anticuerpos GR Y STAT5b. B) Densitometría de banda calculada para cada tratamiento a partir del inmunoblot. Las células se trataron con 1,0  $\mu$ M de PRED o con vehículo por 5 min. La condición basal indica que las células presentan únicamente medio y SFB, conforme a las condiciones manejadas para su cultivo. El control positivo es extracto total de MCF7

## 5.5 Efecto de PRED en la colocación de STAT5b y GR al núcleo

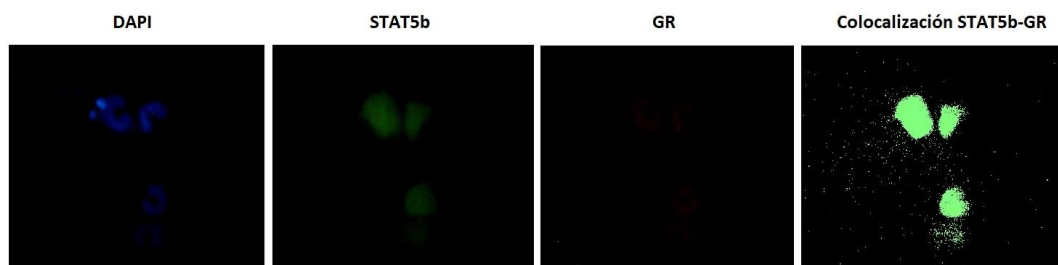
A partir del inmunoblot, se pudo reconocer la formación aparente del complejo GR-STAT5b en citoplasma; sin embargo, aún no es claro si el complejo formado se

colocaliza al núcleo y que implicaciones puede tener esta asociación en el papel que desempeña el receptor de GC.

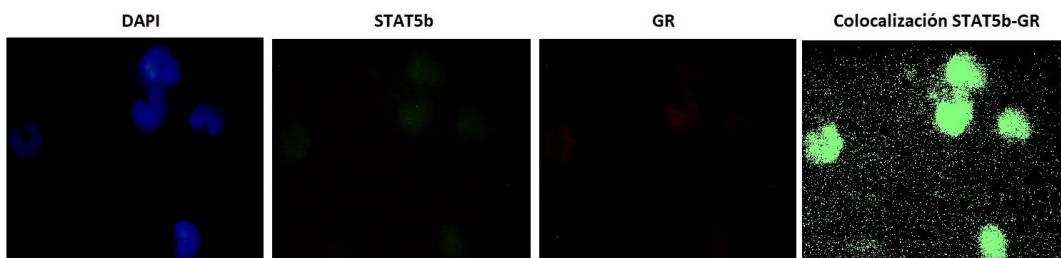
Al respecto, se evaluó la colocalización de las proteínas STAT5b y GR a núcleo en CCRF-SB por microscopía de fluorescencia, y apoyado con el programa ImageJ y su complemento Colocalization-Colormap. El programa se encarga de cuantificar y registrar en microfotografías, las señales fluorescentes colocalizadas, producto de la superposición de los registros microfotográficos. El reporte generado por el programa, muestra los valores de nMDP (producto de desviación media normalizada), los cuales varían de -1 a 1, y se visualizan en una escala de colores, donde los índices negativos están representados por colores fríos (exclusión) y los índices superiores a 0 están representados por colores calientes (colocalización) (84)

Las microfotografías obtenidas en los tiempos de 0, 5 y 15 min post-tratamiento, no mostraron diferencias. Por tanto, los datos que se muestran a continuación, corresponden al tiempo de 5 min.

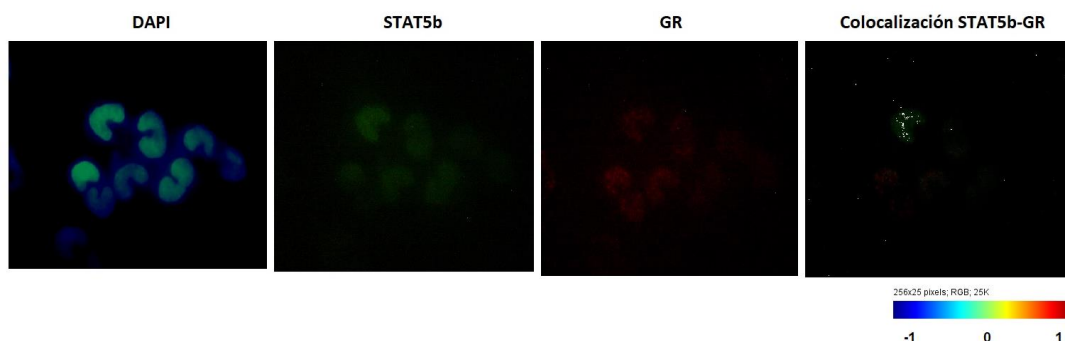
### Basal



### Vehículo



## PRED



**Figura 11. Microfotografías de inmunofluorescencia registradas en células CCRF-SB para STAT5b y GR.** Las células se trataron en presencia o ausencia de 1,0  $\mu$ M de PRED por 5 min y se marcaron para STAT5b y GR conforme a lo descrito en la metodología. Las condiciones basales indican que las células presentan únicamente medio y SFB, conforme a las condiciones manejadas para su cultivo.

Conforme a lo anterior, se observa que las células no se colocan en ausencia de PRED, ya que la distribución de las intensidades conforme a los valores de nMDP representados en la barra de colores (inferior derecha de la imagen), registran intensidades menores a 0, tal como se ilustra en la figura 12.

En presencia de PRED los valores de nMDP relacionados en la barra de colores y la imagen de colocación, permiten evidenciar un ligero aumento en la fluorescencia emitida por STAT5b y GR al interior del núcleo, debido a la colocación nuclear del complejo (ver figura 12). Lo anterior sugiere que también se esté dando una interacción entre STAT5b y GR en presencia de PRED al interior del núcleo.

Sin embargo, el experimento no nos permite corroborar si la interacción entre STAT5b y GR en núcleo, se está dando por acción del medicamento o por otras condiciones asociadas, y si esta interacción puede estar modificando la actividad transcripcional de GR en las células resistentes.

## 6. Discusión

La leucemia linfocítica aguda de linaje B es uno de los tipos más comunes de cáncer en niños, y es tratado con una terapia basada en combinaciones de medicamentos. La prednisolona ha sido el glucocorticoide más comúnmente utilizado en la terapia de la LLA, ya que ocasiona menos efectos adversos comparados con la dexametasona, pues se ha reportado que esta última induce infección, promueve la destrucción de la matriz orgánica del tejido óseo, osteonecrosis, miopatía, entre otros (74). La prednisolona en particular, es un GC sintético con alta afinidad por el GR y baja afinidad por el receptor mineralocorticoide (MR), lo que hace más efectiva su acción (75).

Por lo general, se administra durante 4 semanas consecutivas en combinación con vincristina, antraciclina, asparaginasa y quimioterapia intratecal (2,5,15).

La eficacia relativa de PRED depende de la dosis administrada, pues ya se ha mostrado que a concentraciones cercanas a 3.5  $\mu\text{M}$  de PRED, este produce un grado de toxicidad del 50% en muestras celulares de pacientes con LLA (4, 74).

Tomando en consideración lo anterior, al momento de evaluar el efecto de PRED en la proliferación y muerte celular de las células SUP-B15 y CCRF-SB (ambas de LLA de linaje B), se reconoce que la línea celular SUP-B15 es dependiente de la dosis de PRED y del tiempo de exposición al medicamento. A mayores concentraciones de PRED la viabilidad celular disminuye; y a mayor tiempo de exposición al medicamento, menor índice de proliferación celular. Esto último se

relaciona con investigaciones anteriores, donde se ha mostrado que a una dosis fija de GC, las células sensibles logran alcanzar los mayores índices de muerte celular a tiempos mayores a 48 h posteriores al tratamiento y se logra una acción citotóxica en las células (82).

Mecanismos relacionados con la sensibilidad a GC en esta línea celular también se han descrito; al respecto se ha sugerido que la inhibición de la captación de glucosa inducida por GC conduce a muerte celular (79). También se ha mencionado el papel de FOXO3a el cual media la función citotóxica de los GC al translocarse al núcleo induciendo la expresión de dianas como p27Kip1 y Bim, importantes para la detención de la proliferación y la muerte celular en las células sensibles (80), entre otros.

Para línea celular CCRF-SB los resultados no permiten inferir el mismo comportamiento que para la línea sensible, ya que a las mismas condiciones de concentración y tiempo de exposición a PRED, los índices de proliferación y muerte celular se diferenciaron significativamente de SUP-B15, registrando mayores porcentajes de proliferación y menores porcentajes de muerte celular.

Este comportamiento que describe las células CCRF-SB, se asocia con la resistencia que muestran algunas células a GC, entendida esta como la incapacidad de la célula para responder a las respuestas inducidas corriente abajo por la interacción GC-GR (18), y que en el contexto de LLA esta resistencia se relaciona con la incapacidad de las células de linaje linfóide de inducir muerte celular mediada por GC bajo condiciones experimentales o clínicas (43).

Llama la atención en los ensayos de proliferación y muerte celular para CCRF-SB, que en el tiempo de 24 h y a una concentración fija de PRED, el porcentaje de proliferación celular aumenta significativamente en comparación con los tiempos de 0 y 48 h. Lo anterior podría estar asociado a un fenotipo proliferativo que induce una regulación positiva de la glucólisis, fosforilación oxidativa, biosíntesis del colesterol y metabolismo del glutamato, aumentando así las tasas de crecimiento y activación de las vías de señalización PI3K/ AKT/ mTOR y MYC, como se ha visto

en células de LLA de linaje T (81). La activación de las vías bioenergéticas necesarias para la proliferación puede suprimir el potencial apoptótico y compensar la crisis metabólica iniciada por la señalización de GC (89).

Otros autores mencionan que dicho comportamiento se asocia con la prevención de la apoptosis inducida por GC a partir de la inhibición de la entrada de NF-kappaB al núcleo (84,85), o la inducción de un efecto mitogénico en las células (86, 87,88).

Lo anterior resulta de gran importancia clínica en las células leucémicas resistentes, ya que dependiendo de la dosis y el tiempo de tratamiento a PRED en los pacientes LLA resistentes, podrían inducir efectos proliferativos en lugar de supresores.

Otro aspecto que llama la atención, es reconocer cuál es el mecanismo o los mecanismos por los cuales algunas células de LLA muestran resistencia a GC; ya que esto podría mejorar el panorama para los pacientes que muestran esta patología de resistencia al tratamiento con GC.

Al respecto, son muchos los mecanismos que se han evaluado y en esta investigación llama la atención la interacción que se ha reportado entre GR y STAT5 (8, 9), pues se ha descrito que esta puede inhibir la activación de los elementos de respuesta a GC mediada por glucocorticoides (8,32,33). También se ha mostrado en modelos de cáncer de mama que, GR actúa de forma sinérgica tanto con STAT5a como STAT5b inhibiendo el efecto inducido por GC (8), siendo estas dos proteínas claves para evaluar la incidencia que puedan tener en la acción de GR.

Con base en lo anterior, se evaluó inicialmente la expresión de STAT5b en células de CCRF-SB resistentes a GC y se comparó su expresión con la inducida por las células MCF7 de la cual se ha reportado que GR interactúa con STAT5,

modificando las interacciones de STAT5 con otros cofactores o reclutando fosfodiesterasas y proteasas dependientes de fosfoserina (64,68).

De acuerdo a lo observado se evidencia que la expresión de STAT5b en CCRF-SB aumenta con el tiempo de exposición a GC, siendo significativo a las 48 h después del tratamiento. Aunque no se conocen reportes en lo que respecta a la expresión génica de STAT5b en células LLA resistentes a PRED, se puede considerar en un primer momento que el medicamento induce una regulación positiva de la expresión de STAT5b.

En lo que respecta a la expresión de GR en líneas resistentes a PRED, se ha reportado que la exposición a prednisolona no induce cambios en su expresión (70,71); por tanto, la resistencia a GC en LLA no se relaciona con una regulación negativa de la expresión de GR, de allí que no se haya considerado la evaluación de este gen en el presente estudio.

A nivel proteico se ha reportado que, el receptor de glucocorticoides puede establecer interacciones proteína-proteína, independientemente de la unión al ADN, con otros factores de transcripción como la Proteína Activada 1 (AP-1), NF- $\kappa$ B, STAT3 y STAT5, estos últimos factores de transcripción son activados por las citoquinas, lo que resulta en una regulación positiva o negativa de la transcripción inducida por GC (88).

Se ha demostrado que STAT5a y STAT5b son importantes en la mediación de respuestas proliferativas al ser activadas por IL-2, IL-4 e IL-15, y que al interactuar físicamente STAT5 con GR, este interfiere con la ruta de señalización GR en condiciones inflamatorias, influyendo de este modo en la respuesta inmune (73).

Luego de evaluar la expresión génica de STAT5b en las células CCRF-SB, se evaluó la posible interacción proteína-proteína entre STAT5b y GR y se comparó con SUP-B15.



Los inmunoblots para extractos citoplasmáticos inmunoprecipitados con STAT5b, mostraron en primicia una interacción física entre GR y STAT5b, tanto en la línea celular sensible a GC (SUP-B15), como en la línea celular resistente (CCRF-SB) en presencia o ausencia de PRED.

Estos resultados son comparables con investigaciones obtenidas para células COS-7 y células mamarias HC11, donde se ha visto la interacción física entre GR y STAT5b (71, 72, 73); por tanto y conforme a los resultados se puede decir que a nivel citoplasmático la interacción entre GR y STAT5b ocurre tanto en células sensibles y resistentes a GC, aún en ausencia de PRED. Posiblemente las células LLA de linaje B, expresen niveles endógenos de STAT5 y GR, como ya se ha visto en otros modelos linfocíticos (33) y que sustentan lo observado en los inmunoblots.

La interacción física entre GR y STAT5b también se evidenció en el compartimento nuclear, donde solo las células CCRF-SB tratadas con PRED mostraron colocalización de GR y STAT5b. La formación de heterodímeros entre estas proteínas podría estar impidiendo la translocación nuclear eficiente de GR, conduciendo la resistencia a GC.

Aún queda por aclarar si la interacción entre GR y STAT5b es directa o no, y si dicha interacción física afecta la unión de GR con los elementos de respuesta a glucocorticoides para su inducción a apoptosis. De momento solo se muestra que GR y STAT5b interactúan físicamente en líneas de LLA de linaje B.

## 7. Conclusiones

Los ensayos de viabilidad, proliferación y muerte celular, permiten distinguir a SUP-B15 como una línea sensible a PRED, comparado con CCRF-SB. Alcanzando altos de índices de muerte celular a una misma dosis del medicamento y mayor tiempo de exposición al mismo.

La línea celular CCRF-SB se describe como una línea resistente a PRED, al registrar mayores índices de proliferación, asociados de la misma manera con una mayor la actividad metabólica de las células en presencia de PRED. Lo anterior soportado por la activación de vías bioenergéticas que suprimen la acción del medicamento.

Finalmente, en este trabajo se proporciona evidencias que muestran la interacción física entre GR y STAT5b se da tanto en la línea celular sensible como en la línea resistente a PRED. Dicha interacción ocurre la región citoplasmática y es independiente de la presencia de PRED. Sin embargo, el complejo solo se colocaliza a núcleo en presencia de PRED.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Belson, M., Kingsley, B., and Holmes, A. (2007) Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect* 115, 138-145.
2. Jiang, N., Koh, G. S., Lim, J. Y., Kham, S. K., Ariffin, H., Chew, F. T., and Yeoh, A. E. (2011) BIM is a prognostic biomarker for early prednisolone response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol* 39, 321-329, 329 e321-323.
3. Faderl, S., O'Brien, S., Pui, C. H., Stock, W., Wetzler, M., Hoelzer, D., and Kantarjian, H. M. (2010) Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer* 116, 1165-1176.
4. Inaba, H., and Pui, C. H. (2010) Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia: comparison of prednisone and dexamethasone. *Lancet Oncol* 11, 1096-1106.
5. Jiang, N., Kham, S. K., Koh, G. S., Suang Lim, J. Y., Ariffin, H., Chew, F. T., and Yeoh, A. E. (2011) Identification of prognostic protein biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *J Proteomics* 74, 843-857.
6. Geley S., Hartmann B., Hala M., Strasser-Wozak E., Kapelari K.& Kofler R. (1996). Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukemia CEM-C1 cells is due to insufficient glucocorticoid receptor expression. *Cancer research*, vol: 56 (21), 5033-8.
7. Bhadri V., Trahair T. & Lock R. (2012). Glucocorticoid resistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Journal of Paediatrics and Child Health*, vol: 48 (8), 634-640.

8. Stoecklin, E., Wissler, M., Moriggl, R., and Groner, B. (1997) Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* 17, 6708-6716.
9. Xu, J., Chen, S., Chen, H., Xiao, Q., Hsu, C. Y., Michael, D., and Bao, J. (2009) STAT5 mediates antiapoptotic effects of methylprednisolone on oligodendrocytes. *J Neurosci* 29, 2022-2026.
10. Shah, D. S., and Kumar, R. (2013) Steroid resistance in leukemia. *World J Exp Med* 3, 21-25.
11. Bhojwani, D., Yang, J. J., and Pui, C. H. (2015) Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 62, 47-60.
12. Pineros, M., Gamboa, O., and Suarez, A. (2011) [Child mortality from cancer in Colombia, 1985-2008]. *Rev Panam Salud Publica* 30, 15-21.
13. Castro, M., Orozco, L., Rueda, E., and Suarez, A. (2007) Epidemiología de la Leucemia Linfoblástica Aguda en Pediatría: Incidencia, Mortalidad y Asociaciones Causales. *Salud UIS* 39, 116-123.
14. Waber, D. P., McCabe, M., Sebree, M., Forbes, P. W., Adams, H., Alyman, C., Sands, S. A., Robaey, P., Romero, I., Routhier, M. E., Girard, J. M., Sallan, S. E., and Silverman, L. B. (2013) Neuropsychological outcomes of a randomized trial of prednisone versus dexamethasone in acute lymphoblastic leukemia: findings from Dana-Farber Cancer Institute All Consortium Protocol 00-01. *Pediatr Blood Cancer* 60, 1785-1791.
15. Guía de Práctica Clínica para la detección oportuna, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de Leucemia Linfóide Aguda y Leucemia Mieloide Aguda en niños, niñas y adolescentes. Guía No. 9. (2013) Ministerio de Salud, Colciencias, Centro Nacional de Investigación en Evidencia y Tecnologías en Salud.
16. Tissing, W. J., Meijerink, J. P., den Boer, M. L., and Pieters, R. (2003) Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 17, 17-25.
17. Sai, S., Nakagawa, Y., Yamaguchi, R., Suzuki, M., Sakaguchi, K., Okada, S., Seckl, J. R., Ohzeki, T., and Chapman, K. E. (2011) Expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 contributes to glucocorticoid resistance in lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Res* 35, 1644-1648.

18. Schlossmacher, G., Stevens, A., and White, A. (2011) Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J Endocrinol* 211, 17-25.
19. Reiter, A., Schrappe, M., Ludwig, W. D., Hiddemann, W., Sauter, S., Henze, G., Zimmermann, M., Lampert, F., Havers, W., Niethammer, D., and et al. (1994) Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 84, 3122-3133.
20. Inaba, H., Greaves, M., and Mullighan, C. G. (2013) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 381, 1943-1955.
21. Ploner, C., Schmidt, S., Presul, E., Renner, K., Schrocksnadel, K., Rainer, J., Riml, S., and Kofler, R. (2005) Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93, 153-160.
22. Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474-2488.
23. Darnell, J. E., Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635.
24. Ohashi, H., Maruyama, K., Liu, Y. C., and Yoshimura, A. (1994) Ligand-induced activation of chimeric receptors between the erythropoietin receptor and receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 158-162.
25. Wakao, H., Gouilleux, F., and Groner, B. (1994) Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J* 13, 2182-2191.
26. Sandoval-Usme M., Umaña-Pérez A., Guerra B., Hernández-Perera O., Hernández-Perera O et. al. (2014). Simvastatin impairs growth hormone-activated signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway in UMR-106 osteosarcoma cells. *PloS one*, vol: 9 (1), e87769.
27. Dong, S., and Tweardy, D. J. (2002) Interactions of STAT5b-RARalpha, a novel acute promyelocytic leukemia fusion protein, with retinoic acid receptor and STAT3 signaling pathways. *Blood* 99, 2637-2646.

28. de Groot, R. P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Jove, R., and Koenderman, L. (1999) STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* 94, 1108-1112.
29. Weber-Nordt, R. M., Egen, C., Wehinger, J., Ludwig, W., Gouilleux-Gruart, V., Mertelsmann, R., and Finke, J. (1996) Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood* 88, 809-816.
30. Wyszomierski, S. L., Yeh, J., and Rosen, J. M. (1999) Glucocorticoid receptor/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) interactions enhance STAT5 activation by prolonging STAT5 DNA binding and tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol* 13, 330-343.
31. Shuai, K. (2000) Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19, 2638-2644.
32. Goleva, E., Kisich, K. O., and Leung, D. Y. (2002) A role for STAT5 in the pathogenesis of IL-2-induced glucocorticoid resistance. *J Immunol* 169, 5934-5940.
33. Biola, A., Lefebvre, P., Perrin-Wolff, M., Sturm, M., Bertoglio, J., and Pallardy, M. (2001) Interleukin-2 inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity through a mechanism involving STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) but not AP-1. *Mol Endocrinol* 15, 1062-1076.
34. Margolin J.F., Steuber C.P., Poplack D.G., (2011) Acute Lymphoblastic Leukemia. Principles and practice of pediatric oncology. Pizzo A, Poplack D. Linpicott Lippincott Williams & Wilkins Publishers; Philadelphia. 6th edition, 518-65.
35. Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A., and van't Veer, M. B. (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9, 1783-1786.
36. Armstrong, S. A., Kung, A. L., Mabon, M. E., Silverman, L. B., Stam, R. W., Den Boer, M. L., Pieters, R., Kersey, J. H., Sallan, S. E., Fletcher, J. A., Golub, T. R., Griffin, J. D., and Korsmeyer, S. J. (2003) Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of

a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell* 3, 173-183.

37. The Leukemia & Lymphoma Society. (2014). Recuperado el 14 de Febrero de 2014, de <http://www.lls.org/content/nationalcontent/resourcecenter/freeeducationmaterials/leukemia/pdf/all.pdf>.
38. Conter, V., Bartram, C. R., Valsecchi, M. G., Schrauder, A., Panzer-Grumayer, R., Moricke, A., Arico, M., Zimmermann, M., Mann, G., De Rossi, G., Stanulla, M., Locatelli, F., Basso, G., Niggli, F., Barisone, E., Henze, G., Ludwig, W. D., Haas, O. A., Cazzaniga, G., Koehler, R., Silvestri, D., Bradtke, J., Parasole, R., Beier, R., van Dongen, J. J., Biondi, A., and Schrappe, M. (2010) Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 115, 3206-3214.
39. Bhojwani, D., and Pui, C. H. (2013) Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 14, e205-217.
40. Pui, C. H., Mullighan, C. G., Evans, W. E., and Relling, M. V. (2012) Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 120, 1165-1174.
41. Spinetta, J. J., Masera, G., Eden, T., Oppenheim, D., Martins, A. G., van Dongen-Melman, J., Siegler, M., Eiser, C., Ben Arush, M. W., Kosmidis, H. V., and Jankovic, M. (2002) Refusal, non-compliance, and abandonment of treatment in children and adolescents with cancer: a report of the SIOP Working Committee on Psychosocial Issues in Pediatric Oncology. *Med Pediatr Oncol* 38, 114-117.
42. Planey, S. L., Abrams, M. T., Robertson, N. M., and Litwack, G. (2003) Role of apical caspases and glucocorticoid-regulated genes in glucocorticoid-induced apoptosis of pre-B leukemic cells. *Cancer Res* 63, 172-178.
43. Schmidt, S., Rainer, J., Ploner, C., Presul, E., Riml, S., and Kofler, R. (2004) Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ* 11 Suppl 1, S45-55.

44. Hardy, R. S., Seibel, M. J., and Cooper, M. S. (2013) Targeting 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: a novel approach to manipulating local glucocorticoid levels with implications for rheumatic disease. *Curr Opin Pharmacol* 13, 440-444.
45. Haarman, E. G., Kaspers, G. J., Pieters, R., Rottier, M. M., and Veerman, A. J. (2004) Glucocorticoid receptor alpha, beta and gamma expression vs in vitro glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leukemia* 18, 530-537.
46. Gruber, G., Carlet, M., Turtcher, E., Meister, B., Irving, J. A., Ploner, C., and Kofler, R. (2009) Levels of glucocorticoid receptor and its ligand determine sensitivity and kinetics of glucocorticoid-induced leukemia apoptosis. *Leukemia* 23, 820-823.
47. Tissing, W. J., Meijerink, J. P., den Boer, M. L., Brinkhof, B., and Pieters, R. (2005) mRNA expression levels of (co)chaperone molecules of the glucocorticoid receptor are not involved in glucocorticoid resistance in pediatric ALL. *Leukemia* 19, 727-733.
48. Oakley, R. H., and Cidlowski, J. A. (2013) The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 132, 1033-1044.
49. Rabbitt, E. H., Gittoes, N. J., Stewart, P. M., and Hewison, M. (2003) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases, cell proliferation and malignancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 415-421.
50. Tao, Y., Gao, L., Wu, X., Wang, H., Yang, G., Zhan, F., and Shi, J. (2013) Down-regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by bortezomib sensitizes Jurkat leukemia T cells against glucocorticoid-induced apoptosis. *PLoS One* 8, e67067.
51. Elkholi, R., Floros, K. V., and Chipuk, J. E. (2011) The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment. *Genes Cancer* 2, 523-537.
52. Gogada, R., Yadav, N., Liu, J., Tang, S., Zhang, D., Schneider, A., Seshadri, A., Sun, L., Aldaz, C. M., Tang, D. G., and Chandra, D. (2013) Bim, a proapoptotic protein, up-regulated via transcription factor E2F1-dependent mechanism, functions as a prosurvival molecule in cancer. *J Biol Chem* 288, 368-381.



53. Ramakers-van Woerden, N. L., Pieters, R., Slater, R. M., Loonen, A. H., Beverloo, H. B., van Drunen, E., Heyman, M., Moreno, T. C., Rots, M. G., van Wering, E. R., Kamps, W. A., Janka-Schaub, G. E., and Veerman, A. J. (2001) In vitro drug resistance and prognostic impact of p16INK4A/P15INK4B deletions in childhood T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 112, 680-690.
54. Scheinman, R. I., Gualberto, A., Jewell, C. M., Cidlowski, J. A., and Baldwin, A. S., Jr. (1995) Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15, 943-953.
55. Nissen, R. M., and Yamamoto, K. R. (2000) The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 14, 2314-2329.
56. Heck, S., Bender, K., Kullmann, M., Gottlicher, M., Herrlich, P., and Cato, A. C. (1997) I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J* 16, 4698-4707.
57. Kordes, U., Krappmann, D., Heissmeyer, V., Ludwig, W. D., and Scheidereit, C. (2000) Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 14, 399-402.
58. Bailey, S., Hall, A. G., Pearson, A. D., and Redfern, C. P. (2001) The role of AP-1 in glucocorticoid resistance in leukaemia. *Leukemia* 15, 391-397
59. Rawlings, J. S., Rosler, K. M., and Harrison, D. A. (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117, 1281-1283.
60. Rogatsky, I., and Ivashkiv, L. B. (2006) Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens* 68, 1-12.
61. Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., and Grusby, M. J. (1996) Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313-319.
62. Biola, A., Andreau, K., David, M., Sturm, M., Haake, M., Bertoglio, J., and Pallardy, M. (2000) The glucocorticoid receptor and STAT6 physically and functionally interact in T-lymphocytes. *FEBS Lett* 487, 229-233.
63. Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J. C., Pieters, R., and Kleiner, J. (2002) Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol* 40, 193-236.

64. Catts V., Farnsworth M., Haber M., Norris M., Lutze-Mann L., et. al. (2001) High level resistance to glucocorticoids, associated with a dysfunctional glucocorticoid receptor, in childhood acute lymphoblastic leukemia cells selected for methotrexate resistance. *Leukemia*, vol: 15 (6), 929-935.
65. Biola, A., and Pallardy, M. (2000) [Mode of action of glucocorticoids]. *Presse Med* 29, 215-223.
66. Hayashi, T., and Faustman, D. (1999) NOD mice are defective in proteasome production and activation of NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 19, 8646-8659.
67. Leclerc, G. M., Leclerc, G. and Barredo, J. C. (2010) AMPK-induced activation of Akt by AICAR is mediated by IGF-1R dependent and independent mechanisms in acute lymphoblastic leukemia. *J Mol Signal* 5, 15.
68. Barash I. (2006) Stat5 in the Mammary Gland: Controlling Normal Development and Cancer. *Journal of cellular physiology J. Cell. Physiol* 209, 305-313.
69. Tissing W., Meijerink J., Brinkhof B., Broekhuis M., Menezes R., Den Boer M. & Pieters R. (2006) Glucocorticoid-induced glucocorticoid-receptor expression and promoter usage is not linked to glucocorticoid resistance in childhood ALL. *Blood Journal* 108, 1045-1049.
70. Webster J.C., Cidlowski J.A. (1994) Downregulation of the glucocorticoid receptor: a mechanism for physiological adaptation to hormones. *Ann N Y Acad Sci.* 216-220.
71. Stöcklin E., Wissler M., Gouilleux F. & Groner B. (1996) Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383, 726-728.
72. Engblom D., Kornfeld J., Schwake L., Tronche F., Reimann A. et. al. (2007) Direct glucocorticoid receptor-Stat5 interaction in hepatocytes controls body size and maturation-related gene expression. *Genes & development* 21, 1157-1162.
73. Cella N., Groner B. & Hynes N. (1998) Characterization of Stat5a and Stat5b homodimers and heterodimers and their association with the glucocorticoid receptor in mammary cells. *Molecular and cellular biology* 18, 1783-1792.
74. Ito C., Evans W., McNinch L., Coustan-Smith E., Mahmoud H., Pui C. and Campana D. (1996). Comparative cytotoxicity of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical*

oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 14, 2370-2376.

75. Pruett S.B., Fan R., Zheng Q. (2003). Characterization of glucocorticoid receptor translocation, cytoplasmic I $\kappa$ B, nuclear NF $\kappa$ B, and activation of NF $\kappa$ B in T lymphocytes exposed to stress-inducible concentrations of corticosterone in vivo. *Int Immunopharmacol* 3, 1-16.
76. Miller A., Komak S., Webb M., Leiter E, & Thompson E. (2007). Gene expression profiling of leukemic cells and primary thymocytes predicts a signature for apoptotic sensitivity to glucocorticoids. *Cancer Cell International* 7, 18.
77. Harada M., Pokrovskaja-Tamm K., Söderhäll S., Heyman M., Grander D et. al. (2012). Involvement of miR17 pathway in glucocorticoid-induced cell death in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 53, 2041-2050.
78. Lippman M., Perry S. & Thompson E. (1974). Cytoplasmic glucocorticoid-binding proteins in glucocorticoid-unresponsive human and mouse leukemic cell lines. *Cancer research* 34, 1572-1576.
79. Buentke E., Nordström A., Lin H., Björklund A., Laane E., et. al. (2011) Glucocorticoid-induced cell death is mediated through reduced glucose metabolism in lymphoid leukemia cells. *Blood Cancer Journal* 1, e31-e31.
80. Consolaro F., Ghaem-Maghami S., Bortolozzi R., Zona S., Khongkow M., et. al. (2015). FOXO3a and Posttranslational Modifications Mediate Glucocorticoid Sensitivity in B-ALL. *Molecular Cancer Research* 13, 1578-1590.
81. Hala M., Hartmann B., Böck G., Geley S. & Kofler R. (1996). Glucocorticoid-receptor-gene defects and resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human leukemic cell lines. *International Journal of Cancer* 68, 663-668.
82. Medh R. D., Saeed M.F., Johnson B.H., Thompson E.B. (1998). Resistance of human leukemic CEM-C1 cells is overcome by synergism between glucocorticoid and protein kinase A pathways: correlation with c-Myc suppression. *Cancer Research*, 3684-3693.
83. Lee J.M., Yan P., Xiao Q., Chen S., Lee K.Y., Hsu C.Y., et al. (2008). Methylprednisolone protects oligodendrocytes but not neurons after spinal cord injury. *J Neurosci* 3141-3149.

84. Jaskolski F., Mülle C. & Manzoni O. (2005) An automated method to quantify and visualize colocalized fluorescent signals. *Journal of Neuroscience Methods* 146, 42-49.
85. Sterzer P., Wieggers G.J., Reul J.M. (2004). Long-term in vivo administration of glucocorticoid hormones attenuates their capacity to accelerate in vitro proliferation of rat splenic T cells. *Endocrinology*, 3630-3630.
86. Zhang Q., Fong C.C., Zhang Y., Tzang C.H., Fong W.F., Yang M. (2008). cDNA microarray analysis of the differentially expressed genes involved in murine preosteoclast RAW264.7 cells proliferation stimulated by dexamethasone. *Life Sci*, 135–148.
87. Neuberger T.J., Kalimi O., Regelson W., Kalimi M., De Vries G.H. (1994). Glucocorticoids enhance the potency of Schwann cell mitogens. *J Neurosci Res*, 300–313.
88. Göttlicher M., Heck S. & Herrlich P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 76, 480-489.
89. Beesley A., Firth M., Ford J., Weller R., Freitas J., et. al. (2009). Glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia is associated with a proliferative metabolism. *British Journal of Cancer* 100, 1926-1936.